

Université de Montréal

**Modulation du trafic des molécules de classe II
par l'isoforme p35 de la chaîne invariante**

par

Maryse Cloutier

Département de Microbiologie et Immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en Immunologie

Juillet, 2019

© Maryse Cloutier, 2019

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée:

Modulation du trafic des molécules de classe II
par l'isoforme p35 de la chaîne invariante

Présentée par :

Maryse Cloutier

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Jean-François Gauchat, président-rapporteur

Dr Jacques Thibodeau, directeur de recherche

Dre Daina Matheoud, membre du jury

Dre Sheela Ramanathan, examinateur externe

Dr Sébastien Talbot, représentant du doyen de la FES

Résumé

La chaîne invariante (Ii) agit à titre de chaperon dans l'assemblage et le trafic des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII). Chez l'humain, les deux isoformes prédominantes, p33 et p35, diffèrent par la présence d'un motif di-arginine (RXR). Ce dernier permet la rétention de p35 au réticulum endoplasmique (RE) jusqu'à son masquage par une molécule de CMHII. La chaîne invariante forme des trimères auxquels s'associent successivement jusqu'à trois dimères $\alpha\beta$ de CMHII résultant en la formation de pentamères, heptamères et nonamères. Toutefois, la stœchiométrie exacte des complexes Ii-CMHII qui quittent le RE et le mécanisme permettant le masquage du motif RXR demeurent un sujet de débats. Dans un premier temps, nous avons examiné par une approche fonctionnelle la stœchiométrie des complexes formés autour de p33 et de p35. Nous avons observé que p35 engendre la formation de complexes nonamériques $(\alpha\beta Ii)_3$ et permet l'incorporation de différents isotypes de CMHII autour d'un même trimère de p35 alors que p33 facilite la formation de pentamères $(\alpha\beta)_1 Ii_3$. Lors de l'étude du masquage du motif RxR par les CMHII, nous avons montré que son inactivation requiert une interaction directe (en cis) entre les sous-unités p35 et CMHII, résultant en une rétention des trimères de p35 insaturés au RE. Aussi, nous avons observé que contrairement aux complexes p33-CMHII, les complexes p35-CMHII sont retenus au RE lorsque coexprimés avec la protéine NleA de la bactérie *Escherichia coli* entérohémorragique. Comme l'expression de NleA interfère avec la formation des vésicules COPII responsable de l'export du RE, nous

supposons que la sortie du RE des complexes p35-CMHII dépend des vésicules COPII alors que la sortie des complexes formés autour de l'isoforme p33 est indépendante de la formation de ces vésicules. La trimérisation d'Ii représente la toute première étape dans la formation des complexes Ii-CMHII. Deux domaines d'Ii permettent la formation de trimères; le domaine de trimérisation (TRIM) et le domaine transmembranaire (TM). Nous nous sommes intéressés à la nécessité de ces domaines dans la trimérisation de la chaîne et la formation subséquente de complexes avec les CMHII. Nous avons démontré que le domaine TRIM n'est pas essentiel à la trimérisation de la chaîne, à la formation de pentamères et de nonamères ainsi qu'au trafic adéquat de ces complexes Ii-CMHII dans la cellule. En absence des domaines TM d'Ii et des CMHII, nous avons observé la formation de complexes pseudo-nonamériques. Ceci suppose que la présence de ce domaine n'est pas un prérequis à la formation de nonamères. En conséquence, la présence d'un seul domaine de trimérisation de Ii est requise pour la formation de trimères et de complexes nonamériques. L'ensemble de nos résultats démontrent que la fonction de p35 n'est pas redondante à celle de p33. p35 influence de manière distincte le trafic des CMHII puisqu'il affecte la stœchiométrie des sous-unités incorporées aux complexes Ii- CMHII.

Mots-clés : Présentation Antigénique, Chaîne Invariante, CMH de classe II, Pentamère, Nonamère, Di-arginine, Réticulum Endoplasmique, NleA, COPII, Trimérisation

Abstract

The invariant chain (Ii) assists in the folding and trafficking of MHC class II molecules (MHCII). Four different isoforms of the human Ii have been described (p33, p35, p41 and p43). The main isoforms, p33 and p35, differ by the presence of a di-arginine (RXR) endoplasmic reticulum (ER) retention motif in p35. This motif is inactivated upon binding of MHCII. In the ER, p33 and p35 assemble into trimers before associating with MHCII. The sequential binding of up to three MHCII $\alpha\beta$ dimers to Ii trimers results in the formation of pentamers, heptamers and nonamers. However, the exact stoichiometry of the Ii-MHCII complex and the mechanism allowing shielding of the ER retention motif remain a matter of debate. To shed light on these issues, we chose a functional approach to examine the stoichiometry of complexes formed around the p33 and p35 isoforms. We showed that p35 promotes formation of nonameric complexes $(\alpha\beta Ii)_3$ while formation of pentameric complexes $(\alpha\beta)_1 Ii_3$ was observed for p33. We then showed that formation of nonameric complexes can result in the inclusion of distinct MHCII isotypes around a single trimeric p35 scaffold. When answering the question whether masking of the p35 RXR motif by MHCII results in the formation of nonamers, we showed that the actual inactivation of motif requires a direct cis-interaction between p35 and the MHCII, precluding ER egress of unsaturated p35 trimers. Interestingly, as opposed to p33-MHCII complexes, p35-MHCII complexes remained in the ER when co-expressed with the NleA protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Expression of this bacterial protein is thought to

interfere with the formation of COPII vesicles, leading to the conjecture that p35-MHCII and p33-MHCII complexes exit the ER in a COPII-dependant and COPII-independent manner, respectively. The trimerization of Ii represents the very first step in the formation of Ii-MHCII complex. Two domains of Ii, the trimerization domain (TRIM) and the transmembrane (TM) domain have been shown to trigger the trimerization of the chain. We focused our attention on the requirement of the two trimerization domains in Ii self-association and in the formation of pentameric and nonameric complexes. We showed that the TRIM domain of Ii is not essential for the chain's trimerization, formation of pentamers and nonamers and for proper traffic with MHCII molecules. In absence of the Ii and MHCII TM domains, we observed the formation of a nonamer-like structure hereby suggesting that the presence of this domain is not a prerequisite for nonamer complex formation. Consequently, our results showed that either Ii trimerization domains are sufficient for Ii trimer formation and nonameric complex trafficking. Taken together, our results demonstrate that the function of the p35 isoform is not redundant, influencing distinctively MHCII trafficking as the subunit stoichiometry of oligomeric Ii/MHCII complexes is affected by p35.

Keywords : Antigen presentation, Invariant chain, MHC class II, Pentamer, Nonamer, Di-arginine, Endoplasmic Reticulum, NleA, COPII, Trimerization

Table des matières

CHAPITRE 1: REVUE DE LITTÉRATURE	1
1. Aperçu de la présentation antigénique	1
1.1 Présentation antigénique de classe I	1
1.2 Aperçu de la présentation antigénique de classe II	2
1.3 La présentation croisée et l'autophagie	5
2. La présentation antigénique de classe II	8
2.2 Cellules présentatrices d'antigènes	8
2.2.1 Cellules dendritiques	8
2.2.2 Cellules B	11
2.2.3 Macrophages	12
2.2.4 Cellules épithéliales thymiques corticales et médullaires	13
2.3 Régulation de l'expression des CMHII	14
2.3.1 Stimulation de l'expression des CMHII	14
2.3.2 Locus CMHII et CIITA	15
3 La chaîne invariante	17
3.1 Isoformes et structure	17
3.1.1 Isoformes de la chaîne invariante	17
3.1.2 Structure de la chaîne invariante	19
3.2 Synthèse et assemblage dans le RE	21
3.2.1 Trimérisation de la chaîne invariante	21
3.2.2 Formation des complexes Ii-CMHII	22
3.2.2.1 Association des CMHII aux chaperons dans le ER	22
3.2.2.2 La stœchiométrie des complexes Ii-CMHII	23
3.2.2.3 Région d'interaction entre la chaîne invariante et CMHII	25
3.2.2.3.1 L'incontournable CLIP	25
3.2.2.3.2 Interaction de la chaîne invariante aux différents allotypes des CMHII	26

3.2.2.4 Autres points d'interactions entre la chaîne invariante et les CMHII.....	28
3.2.2.4.1 Le domaine de trimérisation.....	28
3.2.2.4.2 La Séquence riche en prolines (Pro82, Pro84, Pro85 et Pro87).....	29
3.2.2.4.3 Le domaine transmembranaire	30
3.3 En route vers les endosomes	31
3.3.1 Motif de ciblage associé aux leucines.....	31
3.3.1.1 Ciblage aux endosomes de la chaîne invariante.....	31
3.3.1.2 Motifs de ciblage aux endosomes; le motif tyrosine et le motif leucine	33
3.3.2 Internalisation dépendante de la clathrine et AP2	35
3.3.2.1 Ciblage du motif di-leucine; le cas de la dynamine	35
3.3.2.2 Ciblage du motif di-leucine; le cas de la clathrine	36
3.3.2.3 Ciblage du motif di-leucine; le cas de AP1 et AP2	37
3.4 Compartiments endosomaux; la protéolyse de la chaîne invariante.....	39
3.4.1 Protéolyse de li.....	39
3.4.1.1 Étapes résistantes à la leupeptine	40
3.4.1.1.1 Les cathepsines D et E.....	40
3.4.1.1.2 Protéase à asparagines (AEP).....	41
3.4.1.2 Étapes sensibles à la leupeptine; les protéases à cystéines	41
3.4.1.2.1 La cathepsine S.....	41
3.4.1.2.2 Les cathepsines L et V	43
3.4.1.2.3 La cathepsine F.....	44
3.4.1.3 Modulation de l'activité des protéases à cystéines.....	46
3.4.1.3.1 Les cystatines F et C	46
3.4.1.3.2 Rôle de l'isoforme p41 dans la protéolyse de la chaîne invariante.....	46
3.4.1.3.3 Rôle de l'AEP dans la modulation de l'activité de la CatL.....	48
3.4.2 Dégradation d'antigènes.....	49
3.4.3 HLA-DO et HLA-DM et le chargement des CMHII	49

3.5 Présentation aux cellules T CD4+	52
4 La chaîne invariante et ses autres fonctions.....	54
4.1 La chaîne invariante et la maturation des cellules B	54
4.2 CD74, le récepteur de MIF et de <i>H. pylori</i>	58
4.2.1 Récepteur de MIF.....	58
4.2.1.1 CD74/CD44 récepteur de MIF	60
4.2.1.2 CD74/CXCR récepteur de MIF	61
4.2.2 Récepteur de <i>Helicobacter pylori</i>	64
5 Le trafic de l'isoforme p35 de la chaîne invariante.....	67
5.1 Motifs de rétention au RE	67
5.1.1 Le motif di-lysines, KKXX	67
5.1.2 L'isoforme p35 et son motif di-arginine RXR	70
5.2 Rétention au ER par les vésicules COPI	71
5.3 Masquage du motif RXR de l'isoforme p35	74
5.3.1 Le masquage stérique	75
5.3.2 Le masquage par phosphorylation.....	76
5.3.3 Interférence par la liaison de 14-3-3 ou du domaine PDZ.....	79
5.3.3.1 Interférence par la liaison de 14-3-3.....	79
5.3.3.2 Interférence par la liaison du domaine PDZ, le cas de NMDA.....	82
5.3.4 p35, le masquage par la queue des chaînes β des CMHII.....	83
5.4 Étude de la stœchiométrie des complexes li-CMHII	86
<u>CHAPITRE 2 : RÉSULTATS</u>	<u>89</u>
1 Article 1: L'isoforme p35 de la chaîne invariante favorise la formation de complexes nonamériques avec les molécules de CMHII.	89
2 Article 2: La sortie du RE de l'isoforme p35 de la chaîne invariante requiert une liaison directe avec les molécules de CMHII et est inhibée par le facteur de virulence NleA d' <i>Escherichia Coli</i> Entérohémorragique.....	99

3 Article 3: Le domaine transmembranaire et la région en C-terminale supportent de façon indépendante la trimérisation de la chaîne invariante et l'assemblage des complexes nonméériques avec les molécules de classe II.....	106
<u>CHAPITRE 3 : DISCUSSION</u>	<u>139</u>
1 L'isoforme p35 de la chaîne invariante favorise la formation de complexes nonamériques avec les molécules de classe II	139
1.1. La controverse : être ou ne pas être un nonamère	139
1.2 Historique du trafic li-CMHII	141
1.3 L'isoforme p35 de la chaîne invariante promeut la formation de complexes nonamériques avec les molécules de CMHII	143
1.4 Implications d'une stœchiométrie variable	144
1.4.1 Implication fonctionnelle de la formation des pentamères	146
1.4.2 Implication de la formation des nomamères.....	148
1.4.3 L'importance du ratio des isoformes p33 et p35.....	151
2 La sortie du RE de l'isoforme p35 de la chaîne invariante requiert une liaison directe avec les molécules du CMHII.....	154
2.1 Masquage du motif de rétention de l'isoforme p35	154
2.1.1 Ce que nous savons et ce qu'il nous reste à éclaircir	154
2.1.1.1 Le rôle de la phosphorylation	156
2.1.1.2 Rôle de 14-3-3 dans le transport antérograde de p35	157
2.1.1.1.1 La stabilisation de la conformation par 14-3-3.....	158
2.1.1.1.2 Le masquage par 14-3-3.....	159
2.1.1.1.3 L'échafaudage par 14-3-3	161
3 Transport antérograde de complexes li-CMHII.....	164
3.1Transport antérograde des complexes p33-CMHII.....	164
3.1.1. Transport antérograde par les vésicules COPI.....	165
3.1.2 Transport antérograde par le compartiment ERGIC.....	168

3.1.3 Autres modes de transports indépendants des vésicules COPII.	169
3.2 Transport antérograde dépendant des COPII de p35	170
3.2.1 Aperçu de la formation des vésicules COPII	171
3.2.2 Les motifs di-acidique et di-hydrophobique	172
3.2.3 Le motif valine	175
3.2.4 Le motif di-basique	176
3.2.5 Ciblage des complexes p35-CMHII aux vésicules COPII par 14-3-3	178
3.2.6 L'oligomérisation	179
<u>CHAPITRE 4 : CONCLUSION</u>	<u>183</u>
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>186</u>

Liste des figures

Figures Introduction

Figure 1: Aperçu du trafic des CMHII.

Figure 2: Les isoformes de la chaîne invariante.

Figure 3: Structure de la chaîne invariante.

Figure 4: Stœchiométries des complexes li-CMHII.

Figure 5: Identification des motifs de ciblage aux endosomes de la chaîne invariante.

Figure 6: Clivage de la chaîne invariante.

Figure 7: Implication de la chaîne invariante dans le développement des cellules B.

Figure 8: CD74, récepteur de la cytokine MIF.

Figure 9: CD74, récepteur de *H. pylori*.

Figure 10: Composition des vésicules COPI.

Figure 11: Séquences protéiques des domaines cytoplasmiques des isoformes p33 et p35.

Figure 12: Transport rétrograde de l'isoforme p35 par les vésicules COPI.

Figure 13: Transport antérograde de l'isoforme p35.

Figures Article 1:

Figure article 1, 1: p35 favors the formation of high-order oligomers with MHCII.

Figure article 1, 2: Different MHCII isotypes can bind the same li trimer.

Figure article 1, Supp 1A: A di-lysine motif at the C-terminus of DR β retains HLA-DR in the ER.

Figure article 1, Supp 1B: DR_{myc} is found in vesicular structures.

Figure article 1, Supp 2A: DR_{myc} is retained in the ER in the presence of DR_{KKAA} and lip35 but not lip33.

Figure article 1, Supp 2B: Intracellular localisation of DR_{myc} in the presence of lip35.

Figure article 1, Supp 3: lip35 promotes formation of nonameric complexes with MHCII.

Figures Article 2:

Figure article 2, 1: Schematic representation and trafficking of α SCD.

Figure article 2, 2: Masking of the p35 ER retention motif requires a direct association with the MHCII β chain.

Figure article 2, 3: p33 and p35 exit the ER through different routes.

Figure article 2, Supp 1: lip33 interacts with DR β only in the presence of α SCD.

Figure article 2, Supp 2: COPII vesicle formation assay.

Figures Article 3:

Figure 1: Formation of li trimers in absence of the TRIM domain.

Figure 2: The li C-terminal TRIM domain is not necessary for binding to MHC class II molecules and to egress the ER.

Figure 3: Trimerization through the TRIM domain is sufficient for the formation of high-order complexes.

Figure 4: Lack of bidirectional TRIM interactions prevents formation pseudo-heptamers and/or pseudo-pentamers including β SCD.

Figure 5: The TM domain supports formation of nonameric complexes in the absence of TRIM.

Figure 6: DR is retained by DR_{KKAA} upon formation of nonameric-like structure.

Figures Discussion:

Figure 14: Formation de complexes li-CMHII autour des isoformes p33 et p35.

Figure 15: Transport modélisé des complexes p33-CMHII et p35-CMHII en présence des différents isotypes HLA-DR, DP et DQ.

Figure 16: Mécanismes selon lesquels 14-3-3 interviendrait dans le transport antérograde de l'isoforme p35.

Figure 17: Schématisation des modes de transports antérogrades alternatifs aux vésicules COPII.

Figure 18: Étapes de la formation des vésicules COPII.

Figure 19 : Identification de motifs putatifs de ciblage aux vésicules COPII dans la séquence de l'extension cytoplasmique de l'isoforme p35.

Figure 20 : Illustration des différents mécanismes pouvant promouvoir le transport antérograde des complexes p35-CMHII par les vésicules COPII.

Liste des abréviations

aa	- acide aminé
ADAM22	- récepteur de la disintégrine A et la métalloprotéinase 22
AEP	- endopeptidase à asparagines
AKt	- protéine kinase B
AP	- protéine adaptatrice
B-CLL	- cellules B provenant de patients avec une leucémie lymphoïde chronique
Bcl-2	- protéine anti-apoptotique 2 associée aux lymphomes de cellules B
β COP	- sous-unité β des vésicules COPI
BCR	- récepteur d'antigènes associé aux cellules B
B-LCL Swei	- lignée de cellules B humaines
β 2m	- microglobuline beta2
Cat	- cathepsine
cCD	- cellule dendritique conventionnelle
CD	- cellule dendritique
CD4	- groupe de différenciation 4
CD8	- groupe de différenciation 8
CIITA	- trans-activateur de classe II
CLIP	- le peptide dérivé de la chaîne invariante associée aux molécules de classe II
CMHI	- complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
CMHII	- complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
COPI	- vésicules COP de type I
COPII	- vésicules COP de type II
CPA	- cellule présentatrice d'antigènes
cTEC	- cellule épithéliale thymique corticale
CXCR2	- récepteur de chimiokine CXC 2
DSP	- 3,3'- dithiobis succinimidyl propionate

EDEM1	- protéine α -mannosidase 1 associée à la dégradation au RE
ERAD	- dégradation associée au RE
ERES	- site de sortie du réticulum endoplasmique
ERGIC	- compartiment intermédiaire entre le RE et l'appareil de Golgi
ERGIC53	- protéine 53 associée au compartiment intermédiaire entre le RE et l'appareil de Golgi
ERK-1/2	- kinase régulée par des signaux extracellulaires 1 et 2
ERp57	- protéine du RE p57
GABA _B	- neurotransmetteur de l'acide gamma-aminobutyrique de type B
GAT-1	- transporteur 1 de GABA
GILT	- réductase thiol lysosomale induite à l'IFN γ
GPCR	- récepteur couplé à une protéine G
hCLIP	- le peptide dérivé de la chaîne invariante humaine associée aux CMHII
HLA-DM	- antigènes de leucocytes humains DM
Hsp150	- protéine du choc thermique 150
IFN α	- interféron α
Ig	- immunoglobuline
Ii	- chaîne invariante
Ii-CS	- chaîne invariante portant une modification chondroïtine sulfate
Iip	- fragment peptidique de la chaîne invariante
IL	- interleukine
K _{ATP}	- canal potassique dépendant de l'ATP
KCHIP1	- partenaire d'interaction 1 du canal potassique sensible au voltage
KDEL	- motif de rétention au RE de protéine soluble
Kv4 K ⁺	- canal potassique sensible au voltage
LC	- cellule de Langherhans
LHVS	- leucine-homophenylalanine-vinyl sulfone

mAb	- anticorps monoclonal
MAP	- protéine kinase activée par des agents mitogènes
MARCH1	- protéine possédant un domaine RING-CH associée à la membrane
mCD	- cellule dendritique myéloïde
mCLIP	- le peptide dérivé de la chaîne invariante murine associée aux CMHII
MIF	- facteur inhibiteur de la migration des macrophages
MIIC	- compartiments riche en molécules de classe II
MoCD	- cellule dendritique dérivée de monocyte
mTEC	- cellule épithéliale thymique médullaire
M6PR	- récepteur mannose-6-phosphate
nAChR	- récepteur neuronal d'acétylcholine nicotinique
NMDA	- récepteur de le N-méthyl-D-aspartate
pCD	- cellule dendritique plasmacytoïde
pCMHI	- molécule de classe I chargé d'un peptide
pCMHII	- molécule de classe II chargé d'un peptide
PGE ₂	- prostaglandine E ₂
PI	- inhibiteur de protéase
PI3K	- phosphoinositide 3 kinase
PKA	- protéine kinase A
PKC	- protéine kinase C
PMA	- phorbol 12-myristate 13-acétate
RE	- réticulum endoplasmique
RFXANK	- protéine associée au facteur de régulation X à domaines akyrines répétés
RFXAP	- la protéine associée au facteur de régulation X
RFX5	- 5ième membre de la famille des protéines associées au facteur X
RIP	- protéolyse intramembranaire régulée
RUNX	- facteur de transcription relié à Runt

RXR	- motif di-arginine
SAC1	- la protéine suppresseuse de mutations d'actine 1
SEB	- enterotoxine B de <i>Staphylococcus aureus</i>
Sppl2a	- peptidase à signal peptidique 2a
TAP	- transporteur associé à la préparation d'antigènes
TCR	- récepteur associé aux cellules T
TM	- domain transmembranaire
TNF α	- facteur de nécrose tumoral α
TRIM	- domaine de trimérisation
TSST-1	- toxine 1 du syndrome de choc toxique
VAMP7	- protéine 7 membranaire associée aux vésicules
VSVG	- protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse
WWCII	- domaine WW de classe II
Yxx Φ	- motif basé sur la tyrosine

À mon grand-père Maurice, mes parents

Paulette et Jacques

Remerciements

La réalisation de ce doctorat n'aurait pas été possible sans la présence de personnes clés dans ma vie. Je voudrais tout d'abord remercier mon mentor et directeur de thèse Jacques Thibodeau. Merci Jacques pour m'avoir guidé et inspiré. Merci pour ton amour de la science que tu partages si bien et pour ton support constant. Et surtout, surtout un gros merci pour ta patience, merci d'avoir cru en moi dans les moments difficiles, de la soumission interminables des articles à l'abandon possible du doctorat. Merci de ton inspiration et de ton soutien constants.

Ensuite je voudrais remercier mes collègues de laboratoire passés et présents sans lesquels la réalisation de ce doctorat aurait été impossible. Merci Marie-Hélène Côté «MHC» et Laetitia Genève «Lae» pour le travail de laboratoire toujours droit et impeccable, il n'aura jamais été aussi facile de faire de nouvelles expériences qu'avec vos protocoles et vos conseils. Merci MHC d'avoir été là jusqu'à la fin. Tu es pour moi une amie et une collègue. Un gros merci à mon ami et collègue Jean-Simon Fortin «JSF», sans toi et tes chimères, p35 ne formerait pas de nonamère. Merci pour nos conversations sans fin sur le sujet, du laboratoire, au café Gamba en passant par le bloc de boucher. Merci pour ta collaboration essentielle aux articles. Je voudrais aussi remercier les autres membres du laboratoire, entre autre Marie-Claude Bourgeois-Daigneault «MCBD» pour ton inspiration.

Finalement, je voudrais remercier ma famille et mes amis. Bien sûr, papa et maman, votre soutien constant et votre fierté à mon égard sont à la base de l'ensemble de mes réussites, petites et moins petites. Merci pour votre amour et support inconditionnels. Merci à ma famille Cloutier pour le soutien de près et de loin. Et pour finir, merci à mes amis. Un merci tout spécial à Marc-André Jetté. Merci Marc pour tout ce que tu as fait pour moi, tu auras été là dans les moments les plus difficiles. Je ne sais pas comment j'aurais fait sans toi. Merci d'être dans ma vie.

CHAPITRE 1: REVUE DE LITTÉRATURE

1. Aperçu de la présentation antigénique

1.1 Présentation antigénique de classe I

Chez les organismes vivants supérieurs, la grande majorité des cellules nucléées expriment à leur surface les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMHI)(Pamer et Cresswell, 1998; Oliveira et van Hall, 2013). Lors de la présentation antigénique de classe I, les CMHI présentent, à la surface cellulaire, des peptides dérivés de la protéolyse de protéines endogènes ou dérivées de pathogènes (Oliveira et van Hall, 2013).

Suite à leur synthèse dans le RE (réticulum endoplasmique), la chaîne lourde, une glycoprotéine membranaire, et la microglobuline $\beta 2$ soluble ($\beta 2m$) s'associent pour former les CMHI (Pamer et Cresswell, 1998). Le protéosome, responsable de la dégradation et du recyclage des protéines cytosoliques, génère la majorité des peptides qui seront chargés sur les CMHI (Pamer et Cresswell, 1998). Une protéine transmembranaire physiquement associée aux CMHI, le transporteur associé à la préparation d'antigènes (TAP), assure la translocation des ces peptides du cytosol vers le lumen du RE (Pamer et Cresswell, 1998). Le complexe de chargement peptidique formé des chaperons calréticuline, tapasine et la protéine du RE p57 (ERp57) charge les peptides (8-10 acides aminés) sur les CMHI (Oliveira et van Hall, 2013; Jiang et al., 2017). Finalement, les CMHI chargées d'un peptide (pCMHI)

sont relâchées de TAP et ciblées à la membrane où le peptide est présenté aux cellules T^{CD8⁺} (groupe de différenciation 8) (Pamer et Cresswell, 1998).

1.2 Aperçu de la présentation antigénique de classe II

La section suivante a pour but de présenter les grandes lignes du trafic cellulaire des molécules de classe II et de mettre en relief les sujets qui seront par la suite abordés de manière plus approfondie du point de vue de la chaîne invariante.

La chaîne invariante (Ii) associée au complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) joue un rôle capital dans la présentation antigénique de la voie endosomale. Synthétisée dans le RE, la chaîne invariante trimérise et agit comme échafaudage aux CMHII (figure 1, section 3.2). Sous la forme de trimères, la chaîne invariante s'associe à 3 hétérodimères de CMHII formés des chaînes α et β , et génère le complexe nonamérique $(\alpha\beta Ii)_3$ (voir section 3.2.2) (Roche et al., 1991b; Lamb et Cresswell, 1992). La formation de complexe avec la chaîne invariante assure le bon repliement des CMHII (voir section 3.2.2) et leur ciblage au système endosomal (voir section 3.3). Par son association, la chaîne invariante inhibe la liaison de peptides à la poche de fixation des CMHII au niveau du RE, de l'appareil de Golgi jusqu'aux endosomes. Dans les endosomes, la chaîne invariante est clivée par différentes protéases de manière à laisser le peptide dérivé de la chaîne invariante associée aux molécules de classe II (CLIP) dans la poche de fixation (voir section 3.4) (Blum et Cresswell, 1988; Neefjes et Ploegh, 1992). Par la suite dans les compartiments riches en CMHII (MIICs), la molécule de classe II non-classique des antigènes de leucocytes

humains DM (HLA-DM) catalyse l'échange du CLIP pour un peptide antigène dans la poche de fixation des CMHII (voir section 3.4.3). Les CMHII alors chargées d'un peptide (pCMHII) sont ciblées à la surface cellulaire afin de présenter les peptides chargés aux cellules T CD4⁺ (groupe de différenciation 4) (voir section 3.5).

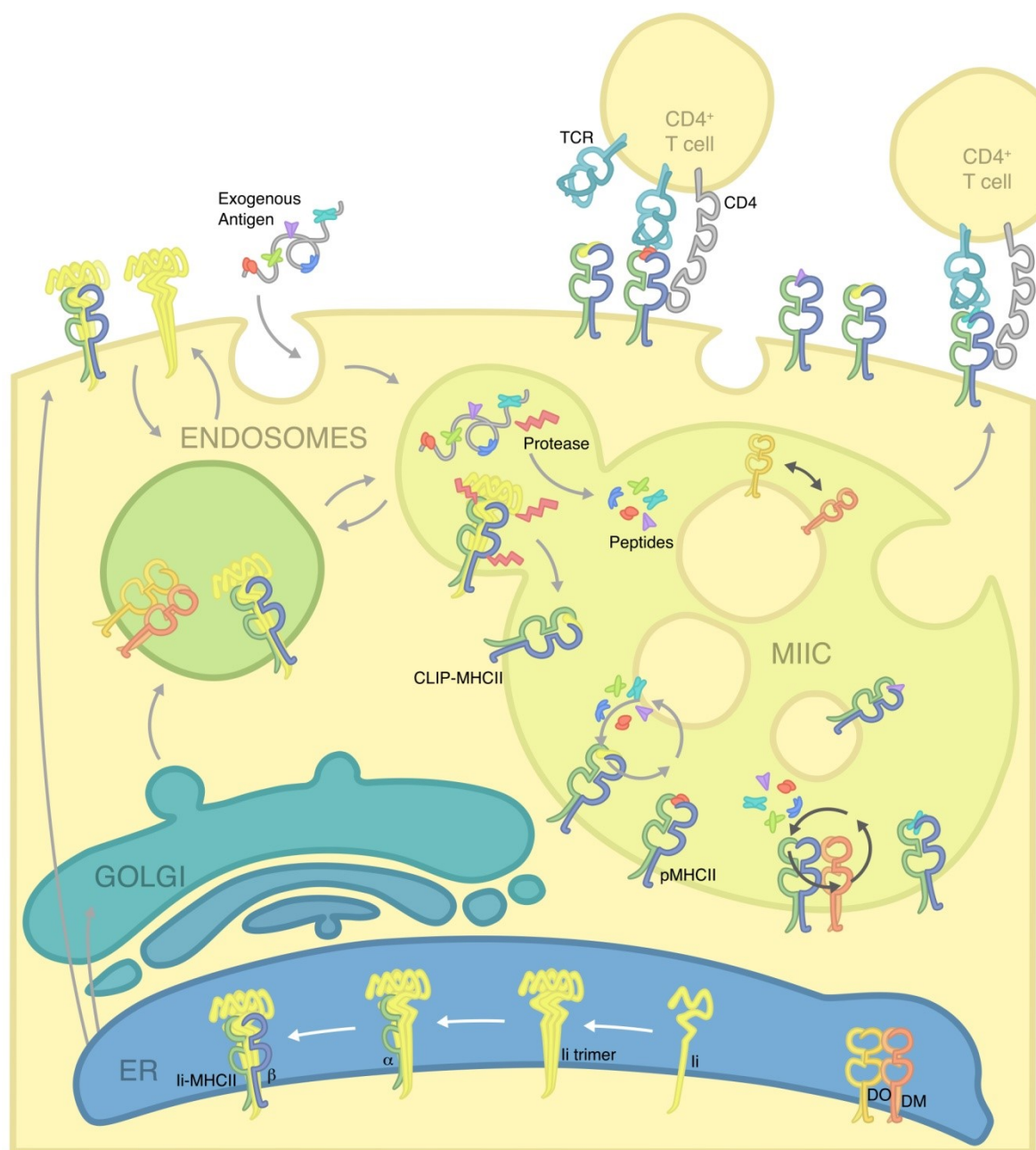


Figure 1: Aperçu du trafic des CMHII.

Dans le RE, la chaîne invariante (jaune) trimérise et s'associe à 3 hétérodimères des chaînes α (vert) et β (bleu) des CMHII formant ainsi un complexe nonamérique ($\alpha\beta I_i$)₃. Le nonamère ($\alpha\beta I_i$)₃ sort du RE et est ciblé vers le système endosomal à partir du trans-Golgi ou de la surface membranaire. Dans les MIICs, la chaîne invariante est clivée par différentes protéases. Toujours dans ces

compartiments, HLA-DM (rouge) catalyse l'échange du CLIP (jaune) pour un peptide antigène dans la poche de fixation des CMHII. Une fois chargées d'un peptide, les pCMHII sont ciblées à la surface cellulaire où s'effectue la présentation aux cellules T CD4+ (figure tirée de la thèse de Jean-Simon Fortin (Fortin, 2013)).

1.3 La présentation croisée et l'autophagie

On a longtemps opposé la présentation d'antigènes endogènes, dérivés du cytoplasme et du noyau, par les CMHI aux cellules T CD8+ à la présentation d'antigènes exogènes par les CMHII aux cellules T CD4+ (Strawbridge et Blum, 2007). Jusqu'au début des années 2000, ces fonctions étaient considérées comme exclusives et sans chevauchement (Strawbridge et Blum, 2007). Cependant, des études plus récentes ont décrit la présentation croisée qui permet aux CMHI et aux CMHII d'accéder et présenter les antigènes provenant des différentes sources (Strawbridge et Blum, 2007).

L'analyse de la séquence des ligands des CMHII ainsi que l'observation de la présentation d'antigènes viraux aux cellules T CD4+ ont permis de confirmer la présence d'antigènes endogènes dans la poche de fixation de peptides des CMHII (Zhou et Blum, 2004). Sachant que ces antigènes endogènes n'ont pas un accès direct au système endosomal, ceci soulève la question à savoir comment ils entrent en présence des CMHII (Trombetta et Mellman, 2005). À cet effet, plusieurs études ont démontré le rôle de la macro-autophagie comme source de peptides antigènes aux CMHI et CMHII (Nimmerjahn et al., 2003; Dengjel et al., 2005; Paludan et al., 2005; Schmid et al., 2007; English et al., 2009).

La macro-autophagie décrit le mécanisme par lequel des organelles et du cytosol sont engouffrés par un autophagosome permettant ainsi de dégrader des protéines cytosoliques ou provenant des organelles de manière à en recycler les acides aminés (Mizushima, 2005; Yorimitsu et Klionsky, 2005). Des conditions de stress tels que, le manque de nutriments, une infection ou la présence de protéines mal repliées peuvent induire l'autophagie. Les compartiments MHC obtiennent de manière continue des antigènes provenant des autophagosomes (Schmid et al., 2007). De façon approximative, environ 10 à 25% des CMHII présentent des antigènes provenant du cytosol ou du noyau (Crotzer et Blum, 2009). Ceci peut augmenter jusqu'à 50% suite à un manque de nutriments qui a pour effet d'augmenter l'activité autophagique (Dengjel et al., 2005).

De plus, l'autophagie médiée par une protéine chaperonne (ie LAMP2A) pourrait représenter une voie alternative pouvant contribuer à la présentation d'antigènes endogènes par les CMHII (Zhou et al., 2005; Perez et al., 2016). LAMP2A permet la translocation de substrats à travers la membrane de lysosomes ou d'endosomes tardifs lors de l'autophagie médiée par une protéine chaperonne (Zhou et al., 2005). Or, il a été démontré que certains auto-antigènes sont présentés par les CMHII aux cellules T CD4+ lors de la surexpression de LAMP2A (Zhou et al., 2005).

Par ailleurs, en 1995, un groupe de recherche propose qu'en absence de CMHII, les trimères de li murin accèdent aux compartiments endosomaux tardifs par l'entremise du compartiment autophagosome (Chervonsky et Sant, 1995). Lors de ces travaux, les auteurs bloquent le transport de la chaîne invariante aux lysosomes par l'utilisation d'un inhibiteur de la voie autophagique (Chervonsky et Sant, 1995). Ce transport de la chaîne invariante au

7
système endosomal par le compartiment autophagosome est caractérisé d'un contournement de l'appareil de Golgi à partir du RE (Chervonsky et Sant, 1995). Ainsi, l'autophagosome serait impliqué à la fois dans la présentation d'antigènes endogènes par les CMHII ainsi que le trafic de la chaîne invariante.

2. La présentation antigénique de classe II

2.2 Cellules présentatrices d'antigènes

Contrairement à la présentation par les molécules de classe I, seules quelques cellules s'acquittent de la présentation antigénique de classe II. Ces cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) sont : les cellules dendritiques, les lymphocytes B, les lignées monocytes/macrophages et chez l'humain, les lymphocytes T activés (Landsverk et al., 2009). Les différentes CPAs se spécialisent dans l'acquisition, l'apprêtement et la présentation des antigènes (Landsverk et al., 2009). L'endocytose ainsi que l'expression des protéases et des CMHII sont modulées en fonction du type cellulaire et du stade de développement de ces différentes cellules (Landsverk et al., 2009). Ainsi, les différentes CPAs adaptent selon leur besoin la machinerie associée à la présentation antigénique de classe II, ceci a pour effet de leur conférer une fonction unique (Landsverk et al., 2009). Nous décrirons dans les sections suivantes les différentes CPAs.

2.2.1 Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (CDs) représentent une population hétérogène de cellules hématopoïétiques localisées dans la plupart des tissus et sont essentielles à l'induction de l'immunité et de la tolérance (Chopin et al., 2012). Il existe deux populations majeures de CDs; les cellules dendritiques myéloïdes (mCDs) aussi appelées cellules dendritiques conventionnelles (cCDs) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pCDs) (Amodio et

Gregori, 2012; Mathan et al., 2013; Ferlazzo et Morandi, 2014). Considérées comme une composante du système immunitaire inné, les pCDs sont spécialisées dans la production d'interféron α (IFN α) lors d'infections virales et jouent un rôle de second plan dans l'activation des cellules T (Chopin et al., 2012). En revanche, les cCDs sont importantes à l'initiation d'une réponse immunitaire et à l'induction de tolérance. Elles sont composées de plusieurs sous-types, dont les cellules de Langherhans (LCs) et les cellules dendritiques dérivées de monocytes (MoCDs) (Young et al., 2008; Chopin et al., 2012; Ferlazzo et Morandi, 2014).

Il existe chez les cCDs un décalage entre la capture de l'antigène et la présentation de celui-ci aux cellules T. Ce décalage résulte de la régulation de la machinerie de présentation antigénique de classe II chez les cCDs et est intimement liée à la maturation de ces cellules. La relation maturation/fonction des cCDs a été décrite dans les années 80 par Schuler et Steinman (Schuler et Steinman, 1985). Ces observations, qui ont mené à la description des CD immatures et matures, montrent un changement dramatique du phénotype et de la fonction des LCs prélevées de l'épiderme de la peau lors de leur culture *in vitro* (Schuler et Steinman, 1985). Très compétentes à la capture d'antigènes dans les tissus périphériques, les cCDs immatures expriment de faibles niveaux de CMHII et de molécules costimulatrices des cellules T (CD40, CD86 et CD80) à leur surface (Matsuno et al., 1996; Pierre et al., 1997). L'exposition à des stimuli inflammatoires et à des agents infectieux induit la maturation de ces cCDs qui migrent vers les ganglions lymphatiques (Sallusto et al., 1995; De Smedt et al., 1996; Matsuno et al., 1996). La maturation de ces cellules est caractérisée par une augmentation passagère de leur capacité à internaliser des

antigènes, suivie d'une importante diminution de l'internalisation (Sallusto et al., 1995; Matsuno et al., 1996). Elle est également caractérisée par une augmentation de l'expression en surface des CMHII et des molécules costimulatrices (Viola et Lanzavecchia, 1996; Pierre et al., 1997). En conséquence, la perte de la capacité à capturer des antigènes suite à leur activation se traduit par une incapacité à présenter des antigènes rencontrés par des cCDs matures. L'expression en surface des complexes pCMHII permet aux CDs matures de présenter des antigènes rencontrés dans les organes périphériques aux cellules T CD4+ localisées dans les organes lymphatiques (Pierre et al., 1997).

On observe dans les CDs matures une diminution du taux d'ARNm codant pour les CMHII; c'est-à-dire que la synthèse *de novo* de ces molécules n'explique pas l'augmentation observée de l'expression des CMHII lors de la maturation des CDs (Landmann et al., 2001). Des études plus récentes démontrent que des modifications au niveau post-traductionnel modulent l'expression en surface des CMHII; cette modulation est intimement liée à l'activité d'une E3 ligase, MARCH1 (protéine possédant un domaine RING-CH associée à la membrane). Dans les CDs immatures, l'ubiquitination des CMHII (Shin et al., 2006) par MARCH1 assure leur internalisation dans les compartiments endosomaux (De Gassart et al., 2008). Suite à la dégradation de la chaîne invariante associée aux CMHII, la chaîne β des complexes CMHII en surface est ubiquitinée par MARCH1 (De Gassart et al., 2008; Thibodeau et al., 2008). Lors de l'induction de la maturation des CDs, le niveau de CMHII ubiquitinée diminue drastiquement (Shin et al., 2006; van Niel et al., 2006), résultant en une diminution de la vitesse du recyclage des CMHII et une augmentation de l'expression des complexes pCMHII en surface (Cella et al., 1997).

2.2.2 Cellules B

Contrairement aux CD₄, les cellules B expriment les CMHII de façon précoce dès un stade pro-B (Chen et al., 2002; Boss et Jensen, 2003). Lors des stades de développement subséquents, l'expression des CMHII augmente jusqu'à la différenciation des cellules B en plasmocytes où la transcription est arrêtée (Lala et al., 1979; Piskurich et al., 2000; Boss et Jensen, 2003). Les cellules B sont moins compétentes que les CD₄ à présenter des antigènes et activer des cellules T; la présentation d'antigènes par les lymphocytes B est communément intimement liée à leur fonction primaire de sécrétion d'anticorps (Watts, 1997; Trombetta et Mellman, 2005). Étant donné leur faible disposition à la phagocytose, ces cellules dépendent de la présence de récepteurs d'antigènes des cellules B (BCR) pour la capture de ces derniers à leur surface (Lanzavecchia, 1990; Watts, 1997; Trombetta et Mellman, 2005). Ces BCRs sont des complexes multimériques formés d'immunoglobulines (Ig) de surface, généralement des IgM et IgD, associées à des hétérodimères Ig α /Ig β , et peuvent reconnaître un grand nombre d'antigènes (Watts, 1997). L'activation du récepteur BCR par la liaison d'un antigène se traduit par une cascade de signalisation intracellulaire via le domaine cytoplasmique des hétérodimères Ig α /Ig β (Watts, 1997; Siemasko et al., 1998). Dans un premier temps, l'activation du récepteur induit la phosphorylation rapide (via les Src-kinases) des clathrines associées aux radeaux lipidiques, ce qui a pour effet d'accélérer l'internalisation du BCR (Stoddart et al., 2002). A ceci s'ajoute la formation *de novo* de corps multivésiculaires ainsi qu'une augmentation de la synthèse des CMHII et leur accumulation dans les compartiments MIICs (Siemasko et al., 1998; Zimmermann et al.,

1999; Boes et al., 2004). Dans les MHCs, les antigènes associés aux BCRs pourront être chargés sur les CMHII et présentés aux cellules T (Siemasko et al., 1998; Zimmermann et al., 1999; Boes et al., 2004). Ainsi, l'activation des BCRs facilite à la fois la capture, l'apprêtement d'antigènes et leur présentation aux cellules T tout en induisant l'activation des cellules B et la production d'anticorps spécifiques à ces mêmes antigènes (Clark et al., 2004). Étant donné que l'efficacité de la présentation antigénique est proportionnelle à la quantité d'antigènes rencontrés, la présentation antigénique de classe II aux lymphocytes T CD4+ par les cellules B joue essentiellement le rôle de jauger la durée de la réponse humorale plutôt qu'un rôle dans l'initiation de cette réponse.

2.2.3 Macrophages

Les macrophages possèdent une capacité singulière de phagocytose; ces cellules sont capables d'internaliser jusqu'à 50% de leur surface cellulaire et sont capables d'internaliser virtuellement tous types d'antigènes qu'ils soient associés à leur membrane ou solubles, de manière non-spécifique ou spécifique via des récepteurs (Trombetta et Mellman, 2005). Les macrophages expriment les CMHII et les molécules costimulatrices dont l'expression augmente suite à leur activation par des cytokines pro-inflammatoires ou des produits bactériens (Trombetta et Mellman, 2005). Les macrophages sont localisés majoritairement dans les tissus non-lymphoïdes, la pulpe rouge de la rate, les régions sous-capsulaire et médullaire des ganglions lymphatiques de sorte à ne pas être en contact avec les lymphocytes T CD4+ (Itano et Jenkins, 2003). N'étant pas en contact direct avec les

cellules T CD4⁺ lors de la phase d'initiation de la réponse immunitaire, les macrophages joueraient plutôt un rôle de CPA lors des stades ultérieurs de cette réponse lorsque les cellules effectrices CD4⁺ auront migré dans les tissus où ils résident (Itano et Jenkins, 2003).

2.2.4 Cellules épithéliales thymiques corticales et médullaires

Le développement des cellules T matures tolérantes au soi résulte de la sélection positive et négative de ces dernières par les cellules épithéliales thymiques corticales (cTECs) et médullaires (mTECs), respectivement (Alexandropoulos et Danzl, 2012). Les lymphocytes T produits dans la moelle osseuse migrent vers le thymus où ils se différencient de manière à exprimer le récepteur associé aux cellules T (TCR) et les corécepteurs CD4 et CD8 (Shinkai et al., 1993). Dans le cortex du thymus, les cellules doubles positives (CD4⁺/CD8⁺) sont soumises à une sélection positive; leur survie et leur engagement en lignées CD4⁺ ou CD8⁺ dépendent de leur interaction avec des CMHII ou CMHI chargées de peptides du soi sur les cTECs (Ashton-Rickardt et al., 1993; Takahama et al., 1994; Klein et al., 2009). Suite à une sélection positive résultant d'une interaction TCR/CMH de faible affinité, les cellules sélectionnées régulent à la baisse le récepteur non-engagé, et sous la forme de simples positives migrent vers le thymus médullaire (McCaughy et al., 2007). Dans cette région du thymus, la sélection négative est alors effectuée par les mTECs (Alexandropoulos et Danzl, 2012). À l'opposé des cTECs, ces cellules ont la capacité d'exprimer et de présenter des antigènes spécifiques à différents tissus et offrent un miroir du soi périphérique (Derbinski et al., 2001; Gotter et al., 2004). La force de l'interaction

TCR/CMH dicte le sort des cellules T (Alexandropoulos et Danzl, 2012). Contrairement aux peptides retrouvés sur les CMHII des CPAs traditionnelles, les peptides présentés par les CMHII des cTECs et d'un sous-ensemble des mTECs proviennent majoritairement de l'autophagie de matériel cytoplasmique subséquemment transféré vers les compartiments endosomaux (Nedjic et al., 2009).

2.3 Régulation de l'expression des CMHII

2.3.1 Stimulation de l'expression des CMHII

Contrairement aux CMHI exprimées de manière constitutive sur la majorité des cellules, l'expression des CMHII est plus étroitement régulée et est restreinte à un petit nombre de cellules spécialisées (Mach et al., 1996). L'expression constitutive des CMHII est principalement limitée aux CPAs décrites plus-haut (Mach et al., 1996; Pai et al., 2002). Il est toutefois possible d'induire leur expression par divers stimuli chez les cellules dites négatives pour les CMHII (Mach et al., 1996; Boss et Jensen, 2003; LeibundGut-Landmann et al., 2004). L'IFN γ , qui est incontestablement le plus efficace de ces stimuli, est capable d'amplifier l'expression des CMHII chez les lignées monocytes/macrophages et d'en induire l'expression chez des cellules non-professionnelles, incluant les fibroblastes, les astrocytes, les cellules endothéliales, épithéliales et musculaires (Mach et al., 1996; Boss et Jensen, 2003; LeibundGut-Landmann et al., 2004). D'autres stimuli présentent des effets distincts en fonction du type cellulaire ciblé (Mach et al., 1996). Par exemple, l'interleukine 10 (IL-10) induit l'expression des CMHII dans les lymphocytes B (Go et al., 1990) alors qu'il diminue

l'expression des CMHII à la surface cellulaire de manière post-traductionnelle dans les monocytes (Thibodeau et al., 2008). Finalement, l'expression des CMHII est inductible par contact cellule/cellule des cellules suivantes : cellule T/cellule B, cellule T/CD et cellule NK/cellule endothéliale (Mach et al., 1996).

2.3.2 Locus CMHII et CIITA

Chez l'humain, les gènes codant pour les protéines associées à la présentation antigénique de classe II sont regroupés sur le bras court du chromosome 6 à l'exception de la chaîne invariante localisée sur le chromosome 5 (q32) (Landsverk et al., 2009). Étant donné le rôle central de la chaîne invariante dans la présentation antigénique de classe II, il n'est pas étonnant de retrouver un même module de régulation pour l'expression des CMHII et de celle-ci (Korman et al., 1985; Levine et al., 1985). Ce module de régulation est constitué de 4 séquences, S, X, X2 et Y qui apparaissent dans un ordre, une orientation et un espacement largement conservés pour tous les gènes de toutes les espèces analysées (Mach et al., 1996; Reith et al., 2005). Ce module SXY est présent au sein du promoteur des gènes codants pour les chaînes α et β des différents isotypes des CMHII soit HLA-DR, -DQ et -DP ainsi que des promoteurs des gènes codants pour HLA-DM, HLA-DO et de la chaîne invariante (Reith et al., 2005). Quatre facteurs de transcription forment un complexe qui lie le module SXY et sont associés à l'expression de la chaîne invariante et des CMHII. Ceux-ci sont 1. le transactivateur de classe II (CIITA), 2. la protéine associée au facteur de régulation X possédant des domaines akrynes répétés (RFXANK), 3. le 5^{ème} membre de la famille des

protéines associées au facteur X (RFX5) et 4. la protéine associée au facteur de régulation X (RFXAP) (Reith et al., 2005). Une fois associé au module SYX, le complexe multimérique RFXANK/ RFX5/RFXAP, connu sous le nom de « CMHII enhanceosome », permet le recrutement de CIITA et l'expression de la chaîne invariante et des CMHII (LeibundGut-Landmann et al., 2004; Reith et al., 2005; Kobayashi et Van den Elsen, 2012).

En tant que coactivateur, CIITA est capable de coordonner et de promouvoir différents mécanismes impliqués dans l'activation de la transcription (LeibundGut-Landmann et al., 2004; Reith et al., 2005). Contrairement aux autres facteurs de transcription qui sont abondamment exprimés, la production de CIITA ainsi que son activation sont étroitement contrôlées (Reith et al., 2005). Dans un premier temps, l'expression de CIITA est régulée en réponse à une stimulation par l'IFN γ (Krawczyk et Reith, 2006). Des modifications post-traductionnelles de CIITA, comme sa phosphorylation, son ubiquitination et son acétylation, permettent de moduler sa fonction (Reith et al., 2005; Wu et al., 2009).

3 La chaîne invariante

3.1 Isoformes et structure

3.1.1 Isoformes de la chaîne invariante

Il existe chez l'humain 4 isoformes de la chaîne invariante, p33, p35, p41 et p43, toutes issues d'un même ARNm précurseur (Strubin et al., 1986; O'Sullivan et al., 1987). Les deux formes prédominantes, p33 et p35, résultent de l'usage alternatif de deux codons d'initiation alors que p41 et p43 découlent de l'épissage alternatif de l'exon 6b de l'ARNm précurseur (figure 2) (Strubin et al., 1986; O'Sullivan et al., 1987). L'exon 6b, dont la fonction sera abordée ultérieurement (voir section 3.4.1.3), renferme un domaine thyroglobuline de type I. L'usage du codon d'initiation alternatif à l'origine des isoformes p35 et p43 résulte en la présence d'une extension cytoplasmique de 16 acides aminés (aa) renfermant un motif de rétention au RE. Seules les isoformes p33 (souvent appelé p31 chez la souris) et p41 sont exprimées chez la souris, ce qui implique l'absence d'isoformes avec un motif de rétention au RE. Ce motif et son impact sur le trafic de la chaîne invariante seront développés en détail dans la section 5 de l'introduction.

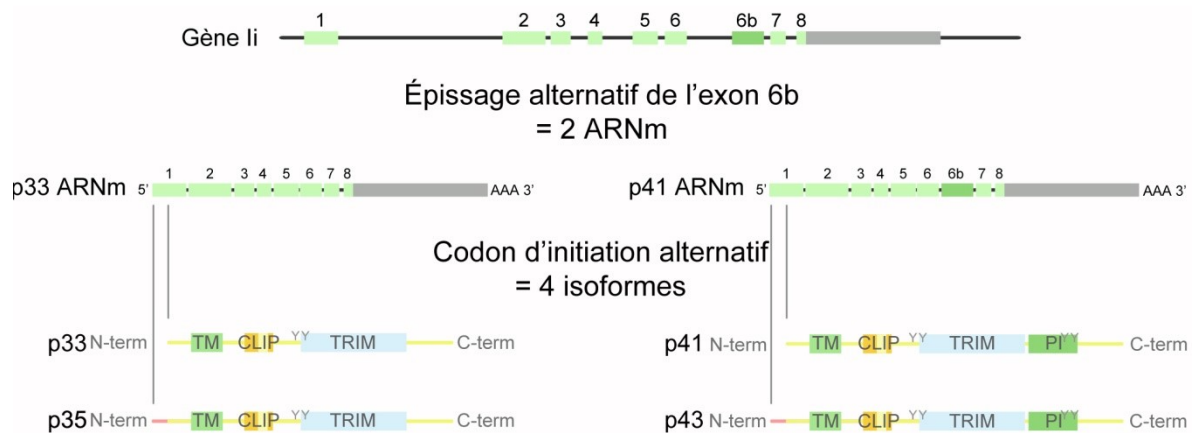


Figure 2: Les isoformes de la chaîne invariante.

Chez l'humain, 4 isoformes sont issues d'un même ARNm précurseur; p33, p35, p41 et p43. L'épissage alternatif de l'exon 6b de l'ARNm précurseur donne lieu à deux ARNm : l'ARNm p33 et l'ARNm p41. Finalement, deux codons d'initiation permettent la production des 4 isoformes. L'usage du codon d'initiation en aval est à l'origine des isoformes p35 et p43, celles-ci possédant une extension cytoplasmique de 16 aa (rose). L'exon 1 code pour la queue cytoplasmique, l'exon 2 correspond au domaine transmembranaire (TM : vert). L'exon 3 code pour une partie de la région luminaire incluant le domaine CLIP (CLIP : jaune, orange) qui permet l'association de la chaîne invariante aux CMHII. L'exon 6 code pour le domaine de trimérisation de la chaîne (TRIM : bleu). Les exons 4 et 5 codent pour la séquence bordée par le CLIP et le domaine TRIM alors que les exons 7 et 8 codent pour la séquence en C-terminale du domaine de TRIM. Les isoformes p41 et p43 se distinguent par l'addition de l'exon 6b codant pour un inhibiteur de protéase (PI : vert).

3.1.2 Structure de la chaîne invariante

La chaîne invariante est une protéine non-polymorphique transmembranaire de type II (figure 3A) (Singer et al., 1984; Strubin et al., 1984). Elle est constituée d'un domaine cytoplasmique de 30 aa (isoformes : p33 et p41), d'un domaine transmembranaire de 26 aa et d'une région luminale de 160 aa. La queue cytoplasmique renferme deux motifs de types di-leucine (LI et ML) permettant le ciblage de la chaîne aux endosomes; ceux-ci seront examinés dans la section 3.3. La chaîne invariante existe sous la forme d'un trimère façonné à la fois par le domaine transmembranaire (TM) (aa : 30-56) (Ashman et Miller, 1999) et le domaine de trimérisation (TRIM) (aa : 118-192) (figure 3B) (Gedde-Dahl et al., 1997; Jasanoff et al., 1998). Nous discuterons dans de plus amples détails de l'implication de ces deux domaines de trimérisation (le TM et le TRIM) dans la section 3.2.1. La chaîne invariante interagit avec les CMHII via sa région CLIP (aa 81-104) qui sera abordée dans la section 3.2.2. La partie du domaine luminal (aa 57-80) bordée par les deux domaines de trimérisation (TM et TRIM) est sensible aux protéases (voir section 3.4.1). Cette région ne semble pas adopter de structure particulière et la flexibilité de celle-ci faciliterait la liaison du CLIP à la poche de fixation des CMHII (Park et al., 1995). Finalement, deux sites de glycosylation se trouvent à l'extrémité N-terminale du domaine TRIM.

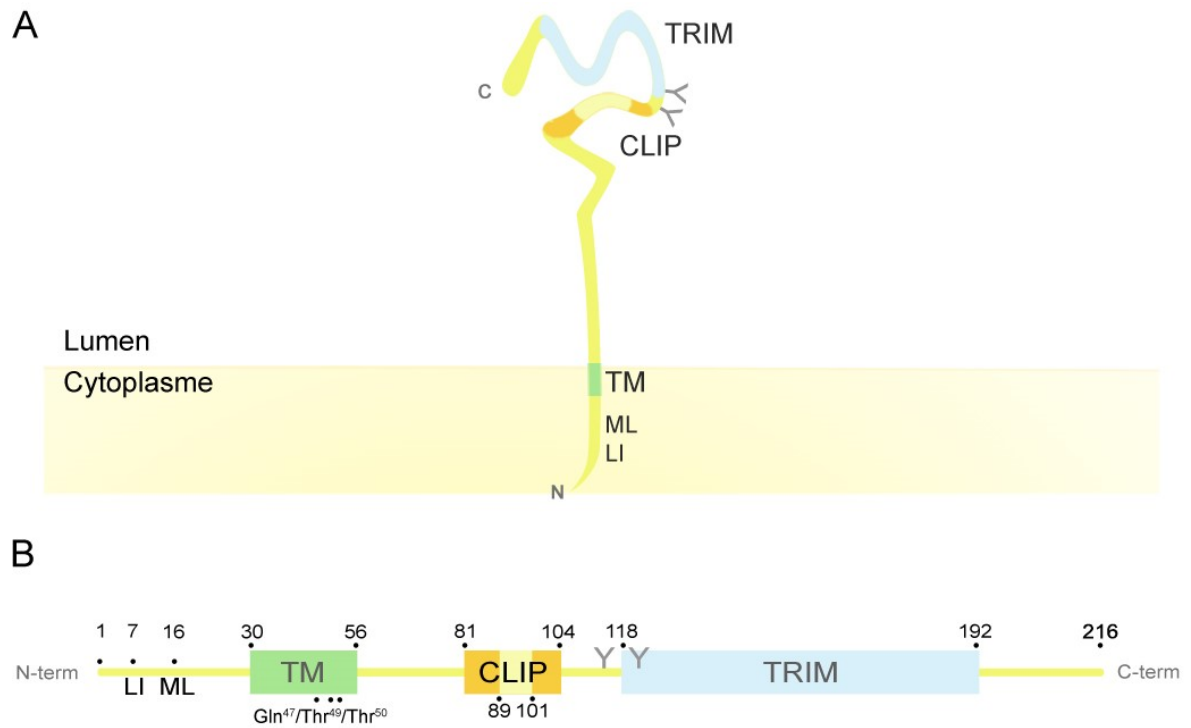


Figure 3: Structure de la chaîne invariante.

(A). Structure et domaine de la chaîne invariante. **(B)** Séquence protéique de la chaîne invariante. L'isoforme p33 de 216 aa possède un domaine cytoplasmique à l'extrémité N-terminale de 30 aa, un TM (vert) de 26 aa et une région luminale à l'extrémité C-terminale de 160 aa. Les motifs di-leucine (LI/ML ; aa 7-8/16-17) permettent le ciblage aux endosomes de la chaîne. Les aa 118-192 forment le domaine TRIM (bleu). La région du CLIP (aa 81-104 ; orange et jaune) lie la poche de fixation des CMHII. La chaîne invariante possède deux sites de glycosylation aux aa 114 et 120.

3.2 Synthèse et assemblage dans le RE

3.2.1 Trimérisation de la chaîne invariante

Rapidement après sa synthèse dans le RE, la chaîne invariante trimérise (Marks et al., 1990; Roche et al., 1991a). Deux domaines distincts sont impliqués dans la trimérisation de la chaîne. Le premier domaine à avoir été identifié se situe dans la région luminale à l'extrémité C-terminale de la chaîne. Ce domaine de trimérisation, résistant aux protéases, est formé de superhélices α (Bijlmakers et al., 1994; Bertolino et al., 1995; Park et al., 1995; Gedde-Dahl et al., 1997). Le deuxième domaine de trimérisation dépend de la présence de résidus hydrophiles polaires (aa Gln47, Thr49 et Thr50, figure 3B) dans la région transmembranaire de la chaîne (Ashman et Miller, 1999). De ces acides aminés, la glutamine semble avoir un rôle important. Une étude a démontré que cet acide aminé est environ sous-représenté d'un facteur 30 par rapport aux autres acides aminés dans le TM de protéines transmembranaires de type I (Landolt-Marticorena et al., 1993). Toutefois, l'oligomérisation de certaines protéines (i.e. : protéines M du coronavirus aviaire, protéine E5 du papillomavirus bovin) dépend directement de la présence de cet acide aminé dans le domaine transmembranaire (Swift et Machamer, 1991; Weisz et al., 1993; Klein et al., 1998). Pour leur part, les thréonines peuvent former des liens hydrogènes entre résidus de différentes chaînes (Ashman et Miller, 1999). En absence des acides aminés Gln47, Thr49 et Thr50 la trimérisation du TM de la chaîne invariante est abolie (Ashman et Miller, 1999). Le rôle et l'implication de la trimérisation de la chaîne invariante seront plus longuement dans l'article 3 de cette thèse.

3.2.2 Formation des complexes li-CMHII

3.2.2.1 Association des CMHII aux chaperons dans le ER

Rapidement après leur synthèse, les chaînes α et β des molécules de classe II s'associent aux trimères de la chaîne invariante. Effectuées par le groupe de Cresswell, des analyses de *pulse-chase* ont mis en évidence l'ajout séquentiel des dimères $\alpha\beta$ aux trimères de la chaîne invariante engendrant successivement : des pentamères $(\alpha\beta)_1I_3$, des heptamères $(\alpha\beta)_2I_3$ et des nonamères $(\alpha\beta)_3I_3$ (figure 4)(Lamb et Cresswell, 1992).

Dans ces expériences, l'absence de dimères $\alpha\beta$ libres soulève la possibilité que l'existence de ces derniers soit de courte durée ou encore que les dimères $\alpha\beta$ soient assemblés à même la chaîne invariante (Lamb et Cresswell, 1992). L'association des CMHII à la chaîne invariante dépend de plusieurs points d'interaction qui seront décrits dans les sections suivantes.

Outre la chaîne invariante, un second chaperon, la calnexine, est impliqué dans l'assemblage des complexes li-CMHII. La calnexine est une protéine résidente du RE qui s'associe à diverses protéines de passage dans cette organelle. Cette protéine chaperonne s'associe entre autres aux Ig, aux TCRs des cellules T et aux CMHI jusqu'à ce que l'assemblage de leur complexe soit complété (Arunachalam et Cresswell, 1995). La calnexine agirait ainsi à titre de molécule de rétention au RE de protéines incomplètement ou imparfaitement repliées et assemblées (Arunachalam et Cresswell, 1995). Dans le RE, les CMHII ainsi que les trimères de la chaîne invariante s'associent à la calnexine jusqu'à ce que la formation du complexe nonamérique soit complété (Anderson et Cresswell, 1994;

Arunachalam et Cresswell, 1995). Finalement, elle permettrait de retenir momentanément la chaîne invariante synthétisée dans le RE évitant ainsi sa dégradation (Romagnoli et Germain, 1995).

3.2.2.2 La stœchiométrie des complexes li-CMHII

Un article paru dans Nature en 1991 par Roche *et al*, dévoile la stœchiométrie des complexes li-CMHII à la sortie du RE (Roche et al., 1991a). Les complexes li-CMHII identifiés par cross-linking et gradients de sucrose apparaissent sous la forme d'un nonamère composé d'un trimère de la chaîne invariante et de 3 dimères $\alpha\beta$ de CMHII dont la masse moléculaire est de 270 kDa (Roche et al., 1991a). Ces résultats corroborés à maintes reprises représentent le modèle communément admis d'assemblage des CMHII aux trimères de la chaîne invariante et qui demeurerait incontesté jusqu'à tout récemment (Lamb et Cresswell, 1992; Newcomb et Cresswell, 1993; Anderson et Cresswell, 1994; Newcomb et al., 1996; Jasanoff et al., 1999; Dixon et al., 2006; Majera et al., 2012). Cependant, en 2011, des travaux du groupe de Springer, proposent une toute autre stœchiométrie des complexes li-CMHII (Koch et al., 2011). Ces auteurs suggèrent l'existence de pentamères formés d'un trimère de la chaîne invariante et d'un dimère $\alpha\beta$ de CMHII (Koch et al., 2011). Leur raisonnement est le suivant : la chaîne invariante étant synthétisée en large excès par rapport aux CMHII, la liaison stochastique des CMHII à la chaîne invariante doit produire des pentamères avec une plus grande probabilité que des nonamères (Koch et al., 2011). Étant donné leur échec à co-immunoprécipiter différents isotypes des CMHII, les auteurs concluent que ceux-ci ne sont pas rassemblés autour d'un même trimère de la chaîne

invariante (Koch et al., 2011). Par ultracentrifugation sur gradient de sucrose, ils estiment le poids d'un oligomère formé de la chaîne invariante et de CMHII à 160kDa, ceci correspondant au poids attendu pour un pentamère (Koch et al., 2011). Ainsi, selon leurs travaux, le pentamère représenterait un complexe accompli, terminal, participant à la présentation antigénique et non un seul intermédiaire à la formation du nonamère (Koch et al., 2011). Ces travaux viennent donc remettre en question le modèle jusqu'ici universellement accepté de l'association des CMHII à la chaîne invariante sous la forme d'un nonamère dans le réticulum (figure 4).

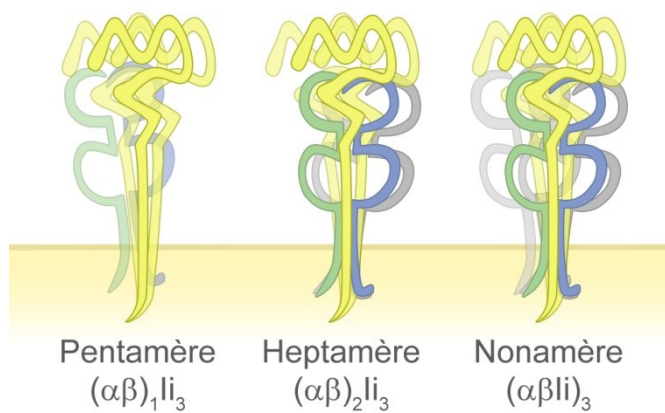


Figure 4: Stœchiométries des complexes li-CMHII.

Les CMHII s'associent autour d'un trimère de la chaîne invariante dans le RE. L'association à la chaîne invariante d'un, de deux ou de trois dimères $\alpha\beta$ résultent en la formation d'un pentamère $(\alpha\beta)_1 li_3$ (gauche), d'un heptamère $(\alpha\beta)_2 li_3$ (centre) et d'un

nonamère $(\alpha\beta li)_3$ (droite), respectivement. Il reste à déterminer si les formations pentamériques et heptamériques représentent des complexes stables capables de sortir du ER.

3.2.2.3 Région d'interaction entre la chaîne invariante et CMHII

3.2.2.3.1 L'incontournable CLIP

Le plus notoire des points d'interaction entre la chaîne invariante et les CMHII est l'interaction de son domaine CLIP (aa 81-104, figure 3) à la poche de fixation de ces dernières (Wilson et al., 1998). En liant la poche de fixation des CMHII, CLIP prévient la liaison d'autres peptides auto-antigènes (Wilson et al., 1998). Cette fonction du CLIP semble toutefois secondaire à son rôle de stabilisation des CMHII. La stabilisation par CLIP assure à la fois un bon appariement des chaînes α et β et empêche la formation d'agrégats. En effet, les CMHII dont la poche de fixation est inoccupée ont une propension à mal se replier et à se dénaturer rapidement (Zhong et al., 1996). L'analyse par rayon X du cristal de HLA-DR3-CLIP a permis d'identifier les résidus 89-101, constituant le « core-CLIP », comme la séquence du domaine CLIP liant la poche de fixation à la manière d'un peptide antigène (figure 3)(Ghosh et al., 1995). Selon ces travaux, les acides aminés M91, A94 et M99 de la chaîne invariante lient les poches 1, 4 et 9 de la poche de fixation des CMHII, respectivement (Ghosh et al., 1995). Remarquablement, une structure de cristal de HLA-DR1 chargé d'un CLIP long (résidus 86-104) dévoile la possibilité d'une liaison bidirectionnelle du CLIP à la poche de fixation des CMHII (Gunther et al., 2010). De plus, des travaux sur HLA-DQ révèle la préférence de certains allèles DQ à différents CLIP soit le CLIP1 canonique (aa 83-101) et les CLIP2 (aa 92-107) et CLIP3 (aa 98-111) non-canoniques (Nguyen et al., 2017). L'ensemble de ces observations suggère un registre de CLIP liant la poche de fixation des CMHII plus large qu'initialement suggéré.

Alors que les poches 4 et 9 sont formées par des résidus des chaînes α et β , la poche 1 est majoritairement formée par des résidus de la chaîne α (Neumann et Koch, 2005). Selon les travaux de Neumann et Koch, les trimères de la chaîne invariante lieraient en premier lieu les chaînes α , formant ainsi des complexes α/I_i auxquels se lieraient les chaînes β (Neumann et Koch, 2005). Or, l'important excès de la chaîne invariante par rapport aux CMHII exprimées par les CPAs favorise les prémisses de la formation de complexe α/I_i plutôt que la formation d'hétérodimères $\alpha\beta$. Les auteurs démontrent que l'association de la chaîne α à la chaîne invariante dépend de la liaison de l'acide aminé M91 à la poche 1 de la chaîne α et proposent que cette stratégie d'assemblage permettrait le bon appariement des isotypes de classe II (Neumann et Koch, 2005).

3.2.2.3.2 Interaction de la chaîne invariante aux différents

allotypes des CMHII

Afin de jouer son rôle de protéine chaperonne, la chaîne invariante doit pouvoir lier toutes les molécules de classe II. Les chaînes α et β des CMHII sont hautement polymorphiques. En effet, des milliers de séquences codant pour DR β ont été identifiées jusqu'à maintenant (Parham, 2018). Sachant que la majorité des résidus marquant le polymorphisme des CMHII se concentrent dans la poche de fixation de celles-ci, il est difficile de concevoir que la chaîne invariante, dont la séquence est hautement conservée, soit capable d'interagir universellement avec une région hautement polymorphique des différentes CMHII. Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer cette interaction li-

CMHII. La première, décrite dans cette partie, suppose que la chaîne invariante interagit et affecte d'une manière distincte les différents allotypes des CMHII. La seconde, qui sera abordée dans la section suivante (section 3.2.2.3), présume que des points d'interaction additionnels entre la chaîne invariante et les CMHII existent au niveau des régions plus conservées.

Dans l'intention de déterminer si CLIP est capable de s'associer de façon équivalente aux différents allotypes des CMHII, Sette *et al*, ont testé la capacité de peptides CLIP synthétiques murin (mCLIP) et humain (hCLIP) à entrer en compétition avec un peptide antigénique pour la liaison des CMHII (Sette et al., 1995). Leurs résultats démontrent que bien que le mCLIP et le hCLIP sont aptes à lier les différentes CMHII, le polymorphisme des CMHII affecte l'affinité de cette liaison (Sette et al., 1995). Notamment, les auteurs ont montré que la force d'interaction du CLIP avec les différents allotypes varie jusqu'à 4 ordres de magnitude. De plus, il a été démontré que la prévalence de certaines maladies auto-immunes semble être associée à une dissociation rapide du peptide CLIP de la poche de fixation des CMHII (Ito et al., 2018).

Par ailleurs, la capacité de différents allotypes des CMHII à dimériser et à accéder à la membrane plasmique a été testée en absence de la chaîne invariante. Chez la souris, il a été démontré que la chaîne invariante est essentielle à l'assemblage des chaînes α et β et au trafic cellulaire de certains variants alléliques ($A\alpha^bA\beta^b$) alors que certains autres variants ($A\alpha^kA\beta^k$, $E\alpha^kE\beta^k$ et $A\alpha^dA\beta^d$) sont indépendants de l'expression de la chaîne (Bikoff et al., 1995). Dans un contexte de transfections, il a été démontré que la présence de la chaîne

invariante augmente jusqu'à dix fois l'expression en surface de dimères dont les chaînes α et β sont désassorties (Layet et Germain, 1991). En revanche, dans un contexte plus physiologique où la chaîne invariante est coexprimée avec différents allotypes, elle réduit la formation de dimères α/β désassortis (Neumann et al., 2007).

3.2.2.4 Autres points d'interactions entre la chaîne invariante et les CMHII

3.2.2.4.1 Le domaine de trimérisation

Outre l'interaction de son CLIP avec la poche de fixation des CMHII, certaines évidences révèlent la présence de points d'interaction additionnels entre la chaîne invariante et les CMHII (Park et al., 1995; Stumptner et Benaroch, 1997; Siebenkotten et al., 1998; Wilson et al., 1998). Notamment, Wilson *et al.*, ont démontré par co-immunoprécipitation que la chaîne invariante conserve sa capacité à lier des CMHII lorsque la poche de fixation de celles-ci est occupée (Wilson et al., 1998). Les premières évidences en ce sens proviennent d'essais de compétition entre la chaîne invariante et des superantigènes pour les CMHII. En 1994, Romagnoli *et al.*, ont démontré que le domaine TRIM de la chaîne invariante est capable de prévenir la liaison de la toxine 1 du syndrome de choc toxique (TSST-1) au domaine $\alpha 1$ des CMHII et de réduire la détection des CMHII par un anticorps spécifique à la chaîne α (Romagnoli et Germain, 1994). Ces résultats suggèrent une interaction entre le domaine de trimérisation et la chaîne α des CMHII (Romagnoli et Germain, 1994). Ces résultats ont été ultérieurement corroborés par trois groupes de

recherche qui ont montré qu'un produit protéolytique de la chaîne invariante représentant son domaine TRIM interagit avec les CMHII (Park et al., 1995; Newcomb et al., 1996; Thayer et al., 1999). Par ailleurs, Newcomb *et al*, démontrent que ce fragment de la chaîne invariante demeure associé aux chaînes $\alpha\beta$ des CMHII suite au clivage de la chaîne (Newcomb et al., 1996).

3.2.2.4.2 La Séquence riche en prolines (Pro82, Pro84, Pro85 et Pro87)

En 1995, Vogt *et al*, constatent la présence de compétition entre l'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* (SEB) et la partie N-terminale de CLIP (aa 71-94) pour l'association aux CMHII suggérant la possibilité d'un domaine d'interaction li-CMHII à cet endroit (Vogt et al., 1995). Subséquemment, Stumptner et Benaroch identifient plus précisément par co-immunoprécipitation l'importance des aa 81-90 de la chaîne invariante dans l'interaction avec les CMHII (Stumptner et Benaroch, 1997). Considérant la teneur en proline de cette séquence (Pro82, Pro84, Pro85 et Pro87), Neumann et Koch ont cherché à identifier une structure de liaison aux prolines sur les domaines $\alpha 2\beta 2$ des CMHII se trouvant à proximité (Neumann et Koch, 2006). Par alignement de séquences, les auteurs découvrent la présence d'une structure capable de lier des régions riches en proline très fortement conservée sur la chaîne β des CMHII chez les vertébrés (Neumann et Koch, 2006). Ce domaine WW de classe II (WWCII) est formé par les aa Tyr123, Asp152 et Trp153 de la chaîne $\beta 2$ (Neumann et Koch, 2006). Les auteurs démontrent que l'expression de la chaîne invariante et de DR α

avec un mutant de la chaîne DR β pour le domaine WWCI (DR β WWCI) résulte en un transport normal des complexes li-CMHII (Neumann et Koch, 2006). Par contre, lorsque qu'en compétition avec une chaîne DR β sauvage, la formation de complexes li-CMHII possédant un mutant DR β WWCI est complètement abolie. Les auteurs suggèrent donc que le bon appariement des chaînes α et β des CMHII passe par l'interaction de la chaîne invariante au domaine WWCI de la chaîne DR β (Neumann et Koch, 2006).

3.2.2.4.3 Le domaine transmembranaire

Le domaine transmembranaire de la chaîne invariante a aussi été proposé comme site d'interaction avec les molécules de classe II et li (Castellino et al., 2001). Un mutant de la chaîne invariante (li-1-82), dépourvu à la fois de son domaine CLIP et de la région en C-terminale, co-immunoprécipite avec les CMHII, suggérant la présence d'un domaine d'interaction li-CMHII additionnel dans cette séquence (Castellino et al., 2001). Lorsque le TM de ce même mutant (li 1-82) est remplacé par celui de la transferrine, également une protéine de type II, la molécule n'interagit plus avec les CMHII (Castellino et al., 2001). Suite à cette observation, les auteurs suggèrent que le domaine transmembranaire constituerait un domaine d'interaction entre les deux protéines. Toutefois, il est possible que l'absence des deux domaines de trimérisation de la chaîne invariante chez ce mutant justifie son incapacité à interagir avec les CMHII. Dans ce cas, le domaine d'interaction aux CMHII identifié dans la séquence 1-82 pourrait ou non être localisé dans le TM.

3.3 En route vers les endosomes

3.3.1 Motif de ciblage associé aux leucines

3.3.1.1 Ciblage aux endosomes de la chaîne invariante

La queue cytoplasmique de la chaîne invariante possède un motif de ciblage aux endosomes. Ce motif permet de localiser la chaîne invariante ainsi que les protéines qui lui sont associées au système endosomal. Dès les années 1980, on identifie l'importance de la chaîne invariante dans le trafic intracellulaire des molécules de classe II (Claesson-Welsh et Peterson, 1985; Sekaly et al., 1986). Dans les années 1990, il est démontré que lorsque surexprimées dans des cellules HeLa en absence de la protéine chaperonne, les CMHII sont détectées majoritairement à la surface cellulaire (Lotteau et al., 1990). Toutefois, en présence de la chaîne invariante, ces molécules colocalisent avec un marqueur d'endosomes tardifs, le récepteur mannose-6-phosphate (M6PR) (Lotteau et al., 1990). Par ailleurs, différents patrons de distribution cellulaire sont observés lors de la dissection de la queue cytoplasmique de la chaîne (p33 sauvage, $\Delta 9p33$ – délétion des 9 premiers aa de p33 et $\Delta 29p33$ – délétion des 29 premiers aa de p33) allant d'une localisation fortement endosomale à majoritairement en surface (figure 5) (Lotteau et al., 1990). Bien que leur identité exacte reste à être élucidée, ces travaux mettent en évidence la présence de deux motifs de ciblage aux endosomes dans la queue cytoplasmique de la chaîne invariante, (Lotteau et al., 1990). Lors d'études subséquentes, il est démontré que la surexpression de la chaîne invariante est associée à la formation de larges structures vacuolaires (Pieters et al., 1993). Les auteurs démontrent que la formation de ces structures positives pour la

chaîne invariante dépend des 11 acides aminés de l'extrémité N-terminale et leur délétion est associée à une forte expression en surface (Pieters et al., 1993). En revanche, la délétion des acides aminés 12 à 29 est plutôt associée à une faible présence à la membrane cellulaire et une localisation dans des vésicules de petites tailles (figure 5)(Pieters et al., 1993).

		Queues cytoplasmiques			Localisation Cellulaire	Références
		1		30		
p31 murin	N-term	MDDQRD L ISN	HEQLP I LGNR	PREPERCSR	endosomes	
p33 humain	N-term	MDDQRD L ISN	NEQLP M LGR	PGAPESKCSR	endosomes	
Δ9p33	N-term	M	NEQLPMLGR	PGAPESKCSR	endosomes/surface	Lotteau <i>et al</i> , 1990
Δ29p33	N-term			MR	surface	Lotteau <i>et al</i> , 1990
Δ11p33	N-term		MQLPMLGR	PGAPESKCSR	surface	Pieters <i>et al</i> , 1993
Δ12-29p33	N-term	MDDQRD L ISN	N-----R		endosomes/surface	Pieters <i>et al</i> , 1993
p33 LI/AA	N-term	MDDQRD A ASN	NEQLP M LGR	PGAPESKCSR	surface	Pieters <i>et al</i> , 1993
p33 ML/AA	N-term	MDDQRD L ISN	NEQLP A AGR	PGAPESKCSR	surface	Bremnes <i>et al</i> , 1994

Figure 5: Identification des motifs de ciblage aux endosomes de la chaîne invariante.

En partant du haut, est représenté la séquence de la queue cytoplasmique des chaînes invariantes murines et humaines, p31 et p33, respectivement. Les séquences suivantes représentent les différents mutants de la chaîne invariante qui ont permis l'identification des motifs de ciblage aux endosomes. À droite, la localisation cellulaire de ces différents mutants et la référence des articles associée. Le mutant Δ9p33, dont les 9 premiers aa sont supprimés est présent à la surface cellulaire et dans les endosomes. La délétion des 29 premiers aa de p33 (Δ29p33) est associée à une localisation en surface. La délétion des acides aminés 12 à 29 du mutant (Δ12-29p33) engendre une localisation à la membrane cellulaire et dans des vésicules de petites tailles. Le rôle des motifs Leu⁷/Iso⁸ et M¹⁶/L¹⁷ a été identifié grâce au mutant p33_{LI/AA} et p33_{ML/AA}, respectivement. La présence des aa Asp² et Aps³ et la Glu12 est importante à la fonctionnalité du motif di-leucines.

3.3.1.2 Motifs de ciblage aux endosomes; le motif tyrosine et le motif

leucine

La queue cytoplasmique des protéines membranaires dissimule des motifs de ciblage spécifiques aux divers compartiments subcellulaires. Le premier motif de ciblage au système endosomal à avoir été caractérisé implique la présence d'une tyrosine dans la queue cytoplasmique de protéines telles que Lamp1 (Williams et Fukuda, 1990), la

phosphatase acide lysosomale (Peters et al., 1990) et la molécule de classe II non-classique HLA-DM (Marks et al., 1995). Cependant, aucunes tyrosines pouvant expliquer le ciblage aux endosomes sont observées dans les queues cytoplasmiques des chaînes invariantes murines comme humaines. Subséquemment, en 1992, un second motif de localisation aux endosomes est identifié dans le domaine cytoplasmique des chaînes CD3 γ et δ du complexe protéique formant le récepteur des cellules T (Letourneur et Klausner, 1992). Ce motif de localisation repose sur la présence d'une séquence di-leucine soit LL, LI ou IL. En 1993, Pieters *et al*, associent le ciblage aux endosomes de la chaîne invariante à la présence des acides aminés Leu⁷ et Iso⁸ dans la séquence cytoplasmique (aa 1-11) en les remplaçant par des alanines, créant un mutant exprimé en surface (figure 5)(Pieters et al., 1993). Alors que le second motif de localisation est attribué aux acides aminés Iso¹⁶ et Leu¹⁷ chez la souris, aucun des motifs préalablement décrits (LL, LI ou IL) n'apparaît en examinant la séquence d'acides aminés 12 à 29 de la chaîne invariante humaine. En revanche, aux positions 16 et 17 de la séquence humaine se situent les résidus ML. Bremnes *et al*, ont démontré par sa mutation que cette séquence est également capable de cibler la chaîne à la voie endosomale (figure 5)(Bremnes et al., 1994). Enfin, Pond *et al*, ont démontré que la présence d'acides aminés acides (Asp ou Glu) en position 4 ou 5 en N-terminale de motifs di-leucine peut jouer un rôle dans l'internalisation et le ciblage dans les sous-compartiments endosomaux (Pond et al., 1995). Ainsi, ils mettent en évidence l'implication des Asp² et Aps³ dans l'internalisation et la formation de larges vésicules associées à la présence du motif di-leucine Leu⁷-Iso⁸ ainsi que l'implication de la Glu¹² dans la fonctionnalité du motif ML (figure 5)(Pond et al., 1995).

3.3.2 Internalisation dépendante de la clathrine et AP2

L'origine du ciblage vers les endosomes de la chaîne invariante et des complexes li-CMHII demeure un sujet de controverse. Alors que plusieurs études suggèrent un ciblage direct des complexes à partir du réseau trans-Golgi (Peters et al., 1991; Benaroch et al., 1995; Peters et al., 1995), d'autres supposent un ciblage indirect à partir de la membrane plasmique (Roche et al., 1993; Castellino et Germain, 1995). La présence de la chaîne invariante à la surface cellulaire de diverses cellules semble favoriser l'hypothèse d'un ciblage à partir de la membrane (Henne et al., 1995; Moldenhauer et al., 1999; Ong et al., 1999). L'ensemble des travaux portant sur l'origine du ciblage sera abordé dans la prochaine section.

3.3.2.1 Ciblage du motif di-leucine; le cas de la dynamine

Dans l'intention de statuer sur le ciblage direct de l'appareil de Golgi ou du ciblage indirect de la surface cellulaire vers les endosomes de la chaîne invariante, Wang *et al.*, ont utilisé une stratégie reposant sur l'expression d'un mutant dominant négatif de la dynamine, le K44A (Wang et al., 1997). En temps normal, suite à son recrutement aux puits de clathrines à la surface cellulaire, la dynamine assure le bourgeonnement de ces vésicules de clathrines et leur internalisation. L'utilisation du mutant dominant négatif K44A de la dynamine empêche la formation des vésicules puisqu'il inhibe l'endocytose dépendante de

la clathrine à partir de la membrane plasmique sans altérer le transport du trans-Golgi aux endosomes (Damke et al., 1994). L'expression de ce mutant K44A dans les cellules HeLa induit une accumulation de la chaîne invariante et des complexes li-CMHII à la surface membranaire (Wang et al., 1997). Ceci suggère un ciblage aux endosomes par le motif di-leucine de la chaîne invariante à partir de la membrane plasmique grâce aux vésicules de clathrines (Wang et al., 1997). De la même façon, Kuwana *et al*, confirment en 1998 l'expression de surface de l'isoforme p35 lorsqu'exprimée avec DR en présence de ce même mutant dynamine dans les cellules HeLa (Kuwana et al., 1998). Étonnamment, une étude reposant sur cette même stratégie du mutant dominant négatif K44A est à l'origine de résultats contraires (Davidson, 1999). Ces travaux suggèrent un ciblage aux endosomes des complexes li-CMHII à partir de l'appareil de Golgi (Davidson, 1999). Cette disparité observée peut être issue du système expérimental ou du niveau d'expression du mutant K44A, de la chaîne invariante et des molécules de classe II.

3.3.2.2 Ciblage du motif di-leucine; le cas de la clathrine

En 1998, un mutant dominant négatif de la clathrine, nommée le fragment hub, est employé lors d'une nouvelle tentative d'établir l'origine du ciblage attribué au motif di-leucine de la chaîne invariante (Liu et al., 1998). Ce mutant «hub» a pour effet de générer des structures non-fonctionnelles de clathrine, permettant ainsi d'inhiber le trafic dépendant de clathrine. Dans un premier temps, les auteurs ont démontré que le ciblage de HLA-DM aux endosomes est complètement dépendant de la clathrine. L'absence de

vésicules fonctionnelles de clathrines lors de l'expression du mutant hub provoque l'accumulation de DM au TGN et accessoirement à la membrane plasmique, ceci suggère un ciblage de DM aux endosomes à partir du TGN et un recyclage de la protéine à partir de la membrane plasmique (Liu et al., 1998). La même stratégie appliquée à la chaîne invariante démontre que lorsqu'exprimée seule ou avec des CMHII, la chaîne invariante quitte le TGN de manière indépendante de la clathrine et est internalisée à partir de la membrane plasmique de façon dépendante de la clathrine (Liu et al., 1998).

3.3.2.3 Ciblage du motif di-leucine; le cas de AP1 et AP2

Le modèle actuel de la formation des vésicules de clathrines repose sur le recrutement de protéines adaptatrices (AP) à la queue cytoplasmique de protéines possédant un motif de ciblage aux endosomes et permettant le recrutement de la clathrine (Rodionov et Bakke, 1998). La convergence de ces complexes «protéine cible/AP/clathrine» provoque la formation de puits avec un manteau de clathrines (Rodionov et Bakke, 1998). Différentes protéines adaptatrices existent, chacune responsable de la formation de vésicules de clathrines à partir de différents sites. Les plus connues, AP1 et AP2, sont essentielles au transport dépendant de la clathrine à partir du réseau trans-Golgi et de la membrane plasmique, respectivement (Bremnes et al., 1998). Par ailleurs, le ciblage à la voie endosomale occasionné par la présence de motifs basés sur les tyrosines ou les leucines (LL, LI, IL ou ML) repose sur leur interaction avec les protéines adaptatrices AP1 et AP2. Ces AP sont formées de deux chaînes lourdes, d'une chaîne légère et d'une chaîne

moyenne (μ) (Marks et al., 1997). De premières études ont démontré que la chaîne μ lie les motifs tyrosines, lui attribuant un rôle de reconnaissance dans les premières étapes du ciblage des protéines à motifs tyrosines (Marks et al., 1997). Subséquemment, à l'aide de la technologie d'expression phagique, Bremnes *et al.*, ont démontré que les motifs LI et ML de la queue cytoplasmique de la chaîne invariante interagissent avec les sous-unités μ_1 et μ_2 des complexes protéiques AP1 et AP2, respectivement (Bremnes et al., 1998). Ces résultats ont été par la suite corroborés par deux études indépendantes démontrant l'interaction de ces sous-unités μ à des peptides correspondant à la queue cytoplasmique de la chaîne invariante (Rodionov et Bakke, 1998; Hofmann et al., 1999).

Des études d'interférences ARN effectuées dans le contexte du récepteur EGF ont démontré que bien que ce dernier interagisse avec des composantes des complexes APs, ces protéines ne sont pas essentielles à son trafic (Nesterov et al., 1995; Hinrichsen et al., 2003; Motley et al., 2003). Or, bien que la chaîne invariante lie plus fortement la sous-unité μ_1 que μ_2 des complexes protéiques AP1 et AP2, respectivement, les résultats obtenus avec les dominants négatifs pour la dynamine et pour la clathrine suggèrent un ciblage dépendant de l'AP2 à partir de la membrane plasmique de la chaîne invariante. Dans le but de trancher définitivement sur l'origine du ciblage des complexes li-CMHII aux endosomes, deux groupes de recherche ont utilisé des siARNs interférant avec la formation des complexes AP1, AP2 ou clathrine (Dugast et al., 2005; McCormick et al., 2005). Ce faisant, ils ont démontré que l'interférence avec les complexes AP1 n'affecte pas le ciblage aux endosomes et subséquemment la protéolyse de la chaîne invariante, alors que la perturbation du trafic

dépendant de AP2 ou dépendant de la clathrine se traduit en une accumulation en surface des complexes li-CMHII et un délai dans l'apparition de CMHII matures (Dugast et al., 2005; McCormick et al., 2005). Comme les CMHII sont endocytées de manière indépendante de la clathrine, la dynamine et de AP2, l'accumulation des complexes li-CMHII en surface est intimement liée à la présence de la chaîne invariante dans ces complexes (Walseng et al., 2008).

3.4 Compartiments endosomaux; la protéolyse de la chaîne invariante

3.4.1 Protéolyse de li

La dégradation de la chaîne invariante s'effectue de manière progressive de sa région C-terminale à N-terminale (figure 6A). Les toutes premières tentatives d'identification des protéases impliquées dans le clivage de la chaîne invariante ont été menées *in vitro*. Lorsque traitée à la leupeptine, un inhibiteur à large spectre de protéases à cystéines, le fragment peptidique lip22 (et lip10 chez la souris) de la chaîne invariante s'accumule dans les lymphocytes B (Blum et Cresswell, 1988; Nguyen et al., 1989; Pieters et al., 1991; Amigorena et al., 1995). Les fragments lip22 et lip10 correspondent aux peptides représentant la région N-terminale de la chaîne invariante et possédant des poids moléculaires de 22kDa et 10 kDa, respectivement. Suite à ces observations, les étapes de la protéolyse de la chaîne invariante ont été classées en deux groupes (figure 6B et C) que nous décrivons dans les sections suivantes :

- les étapes initiales résistantes à la leupeptine (figure 6B) et
- les étapes finales sensible à la leupeptine (figure 6C).

3.4.1.1 Étapes résistantes à la leupeptine

Les premières étapes de la protéolyse de la chaîne invariante restent encore peu caractérisées. Ces premières étapes de clivages ont été attribuées à l'action de protéases aspartiques (Maric et al., 1994) et endopeptidases à asparagines (AEP) (Manoury et al., 2003) (figure 6B).

3.4.1.1.1 Les cathepsines D et E

Les cathepsines D et E (CatD et CatE) sont deux protéases aspartiques initialement identifiées comme responsables des premières étapes de la protéolyse de la chaîne invariante (Maric et al., 1994). L'inactivation de celles-ci par l'utilisation d'inhibiteurs dans une lignée de cellules B humaines bloque le clivage de la chaîne invariante (Maric et al., 1994). En revanche, chez l'humain, l'inhibition spécifique de la CatD, étant la plus abondamment exprimée des deux, n'affecte pas la dégradation de la chaîne invariante dans des lymphoblastomes de cellules B (Riese et al., 1996). De la même façon, l'absence de la CatD, chez une souris CatD^{-/-}, révèle que cette dernière est dispensable à la dégradation de la chaîne invariante (Bohley et Seglen, 1992; Villadangos et al., 1997; Deussing et al., 1998).

3.4.1.1.2 Protéase à asparagines (AEP)

L'AEP est une endopeptidase à asparagines exprimée par les CPAs; de ce fait l'AEP est considérée comme une candidate potentiellement attrayante dans la dégradation de la chaîne invariante (Watts et al., 2005). Dans les CDs immatures, l'AEP est présente sous la forme d'un précurseur inactif et est activée suite à la maturation de ces cellules (Watts et al., 2005). La mutation de sites de clivage potentiels sur la chaîne invariante ou l'inhibition de cette endopeptidase résulte en une accumulation de lip22 dans des lymphocytes B humains et de lip22 et lip10 chez la souris (Manoury et al., 2003). L'AEP cible l'Asn 155 de la chaîne invariante humaine, résultant en lip22, alors que l'Asn 105 (lip10) et l'Asn 153 ou 159 (lip22) sont ciblées chez la souris (Manoury et al., 2003). Toutefois, comme l'inhibition de l'AEP ne suffit pas à stopper intégralement la dégradation de la chaîne invariante chez l'humain et la souris, il se pourrait que d'autres protéases, telles que la CatD, interviennent (Manoury et al., 2003; Maehr et al., 2005; Costantino et al., 2008). En effet, des inhibiteurs à large spectre de protéases à cystéines, de protéases aspartiques et de protéases à asparagines sont nécessaires à l'inhibition complète des premières étapes de dégradation de la chaîne invariante (Costantino et al., 2008).

3.4.1.2 Étapes sensibles à la leupeptine; les protéases à cystéines

3.4.1.2.1 La cathepsine S

La cathepsine S (CatS) est une protéase à cystéines lysosomale à large spectre principalement exprimée dans les CPAs, soit les cellules dendritiques, les lymphocytes B et les macrophages (Riese et al., 1996; Ruckrich et al., 2006; Maubach et al., 2007). À l'origine,

le rôle de la CatS dans la protéolyse de lip10 en CLIP dans les lymphocytes B humains et de souris a été identifié à l'aide d'un inhibiteur spécifique à la CatS (LHVS-leucine-homophenylalanine-vinyl sulfone) (figure 6C)(Riese et al., 1996; Riese et al., 1998). Toutefois, quoique spécifique, cet inhibiteur est capable, selon le dosage, d'inhiber d'autres cystéines protéases (Palmer et al., 1995).

La souris CatS^{-/-} a permis de mettre en évidence l'implication de cette protéase dans la protéolyse de lip10 dans les CPAs; (e.g) les splénocytes (Shi et al., 1999), les CD8 (Nakagawa et al., 1999; Shi et al., 1999), les lymphocytes B (Nakagawa et al., 1999), les macrophages (Nakagawa et al., 1999) ainsi que dans les cellules présentatrices d'antigènes non professionnelles : (e.g) cellules intestinales épithéliales (Beers et al., 2005). Chez l'humain, la dégradation de lip10 en CLIP dépend également de la CatS dans les CPAs : par exemple chez les CD8 (Fiebiger et al., 2001) et les cellules T CD4⁺ (Costantino et al., 2009) et dans certaines cellules non-professionnelles comme des cellules épithéliales (Bania et al., 2003). Deux sites de clivage potentiels (R78-M79 et K80-L81) de la CatS permettant la génération du peptide CLIP ont été identifiés chez l'humain (Ruckrich et al., 2006).

Comme pour le CIITA, l'expression de la CatS est inductible par l'IFN γ (Riese et al., 1996; Ruckrich et al., 2006; Maubach et al., 2007). De manière intéressante, il a été observé que lors de l'induction de l'expression de la machinerie de la présentation antigénique de classe II par CIITA dans les cellules HeLa, la forme lip10 de la chaîne invariante s'accumule (Bania et al., 2003). Ces observations suggèrent l'absence d'expression ubiquitaire de la CatS dans ces cellules, toutefois, suite à son induction par l'IFN γ l'accumulation de la forme lip10 de la chaîne invariante disparaît (Bania et al., 2003). Qui plus est, en réponse aux

cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumoral α (TNF α) et l'IL-1 β , la CatS (ainsi que la CatB) est rapidement surexprimée dans les CD⁺ humaines. En revanche, la cytokine anti-inflammatoire IL-10 bloque cette surexpression et régule à la baisse l'expression de cette protéase (Fiebiger et al., 2001).

3.4.1.2.2 Les cathepsines L et V

La CatL est membre de la famille des cystéines protéases du type papaïne. La CatL, tout comme la CatS, est impliquée dans la dégradation du lip10 en CLIP (figure 6C) (Nakagawa et al., 1998). Chez la souris, la CatL est indispensable à la dégradation de la chaîne invariante dans les cTECs mais ne semble pas jouer un rôle dans les CPAs dérivées de la moelle osseuse (Nakagawa et al., 1998). Ainsi, les souris CatL^{-/-} affichent une sélection thymique positive réduite résultant de l'accumulation de lip10 dans ces cellules (Nakagawa et al., 1998). De ce fait, chez la souris, la CatL est impliquée dans la dégradation de la chaîne invariante dans le thymus alors que la CatS est nécessaire aux cellules présentatrices d'antigènes en périphérie (Tolosa et al., 2003). Pour leur part, les mTECs expriment à la fois les CatS et CatL (Alexandropoulos et Danzl, 2012).

Chez l'humain, l'expression de la cystéine protéase CatV est restreinte aux cTECs et aux cellules des testicules (Tolosa et al., 2003). Cette cathepsine ne possède pas d'orthologue murin, toutefois sa séquence protéique est homologue à 80% à la séquence de la CatL (Tolosa et al., 2003). Ainsi, la CatL murine possède une plus forte homologie avec la CatV qu'avec la CatL humaine. De plus, les résultats obtenus par Tolosa *et al*, suggèrent

que cette CatV agit de façon analogue à la CatL murine dans les cTECs et serait responsable du clivage de lip10 en CLIP dans ces cellules humaines.

3.4.1.2.3 La cathepsine F

Contrairement aux autres CPAs, les macrophages de la souris expriment la CatF, une cystéine protéase capable de cliver lip10 en CLIP (figure 6C) (Nakagawa et al., 1999; Shi et al., 2000). L'expression de la CatF dans les macrophages de souris CatS^{-/-} CatL^{-/-} permettrait de maintenir un certain niveau de présentation antigénique de classe II dans ces cellules (Shi et al., 2000). Bien que la fonction de la CatF chez l'humain reste à confirmer, les travaux de Shi *et al*, démontrent la capacité de cette protéase à cliver la chaîne invariante humaine *in vitro* (Shi et al., 2000).

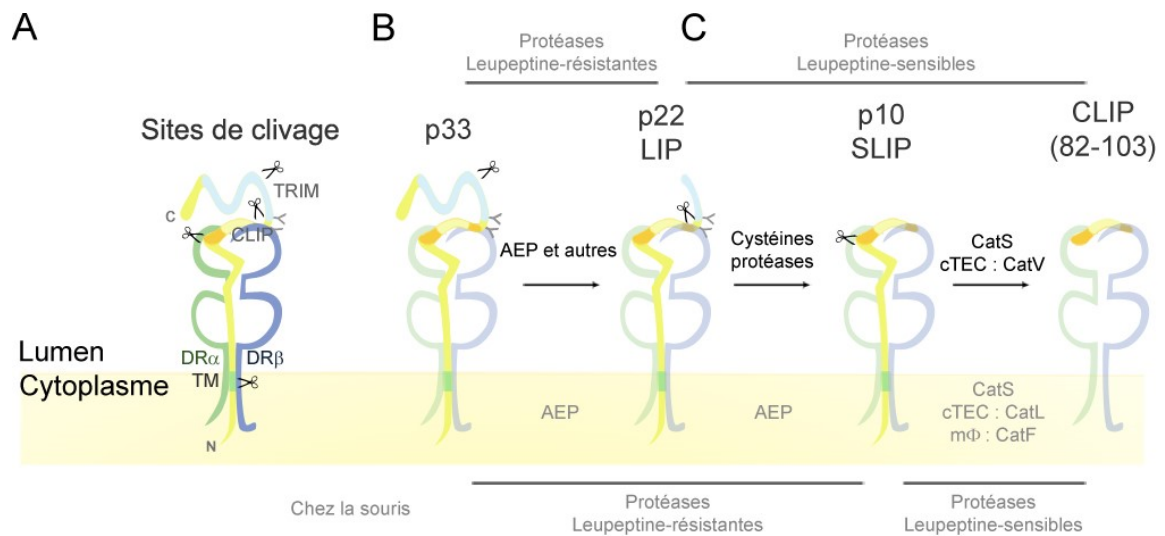


Figure 6: Clivage de la chaîne invariante.

(A) Illustration des sites de clivage de la chaîne invariante en relation avec les CMHII. **(B)** Étapes résistantes à la leupeptine. Chez l'humain, l'AEP et la CatD clivent p33 au niveau du domaine TRIM et génèrent le fragment p22 (aussi nommé LIP). **(C)** Étapes sensibles à la leupeptine. Des protéases à cystéines clivent le fragment p22 à l'extrémité C-terminale du domaine CLIP générant le fragment p10 (aussi nommé SLIP). La CatS, et la CatV chez les cTECs, clivent le fragment p10 de manière à laisser le peptide CLIP dans la poche de fixation des CMHII. En gris au bas de la figure, ces mêmes étapes de clivage chez la souris.

3.4.1.3 Modulation de l'activité des protéases à cystéines

3.4.1.3.1 Les cystatines F et C

Une superfamille de protéines inhibitrices, les cystatines, a coévolué avec les cathepsines afin de moduler leur activité (Magister et al., 2012). La cystatine F, dont l'expression est limitée aux cellules du système immunitaire, est capable d'inhiber l'activité des cathepsines S et L *in vitro* (Langerholm et al., 2005). Chez l'humain, cette cystatine colocalise avec la CatS dans les CD immatures et pourrait conséquemment retarder la protéolyse de la chaîne invariante par cette cathepsine S et conserver un réservoir de CMHII associées à la chaîne invariante (Magister et al., 2012).

La cystatine C, comme la cystatine F, semblerait capable d'inhiber la CatS dans un contexte de surexpression (Pierre et Mellman, 1998). Cette cystatine est exprimée dans les CD immatures dérivées de la moelle osseuse ainsi que dans les CD CD8⁺ de la rate (El-Sukkari et al., 2003). Bien que celle-ci colocalise avec les CMHII et la CatS dans les MHCs, la cystatine C n'est ni nécessaire, ni suffisante à bloquer la dégradation de la chaîne invariante par la CatS (El-Sukkari et al., 2003). Le rôle et la fonction de la cystatine C reste à être élucider chez les CD.

3.4.1.3.2 Rôle de l'isoforme p41 dans la protéolyse de la chaîne

invariante

Suite à la découverte de l'existence des différents isoformes de la chaîne invariante, leurs rôles respectifs dans la présentation antigénique ont fait l'objet de nombreux travaux.

Étant retrouvé chez l'humain et la souris, l'isoforme p41 a fait l'objet des premières études. Les observations initiales ont révélé que l'expression de cet isoforme modifie la présentation antigénique : en effet, p41 possède la capacité de ralentir sa propre dégradation et la dégradation de chaînes invariantes coexprimées résultant en une accumulation du fragment lip12 (Fineschi et al., 1995). L'isoforme p41 diffère de p33 (nommé p31 chez la souris) par 64 acides aminés additionnels codés par l'exon 6b et représente la région la plus fortement conservée de la chaîne invariante (Strubin et al., 1986; Sevilla et al., 2004). Cette séquence, similaire à la thyroglobuline de type I, est riche en cystéines et possède deux sites de glycosylation : Asn239 et Asn253 (Strubin et al., 1986; Bevec et al., 1996; Sevilla et al., 2004). La glycosylation de Asn239 est essentielle à la sortie de p41 du ER (Strubin et al., 1986; Bevec et al., 1996; Sevilla et al., 2004). Cette séquence spécifique à p41 (et p43) est capable de former des complexes non-covalents avec la CatL et d'inhiber l'activité protéolytique de cette dernière (Ogrinc et al., 1993; Bevec et al., 1996; Guncar et al., 1999). Des études ultérieures ont démontré que le fragment de p41 serait aussi capable d'inhiber l'activité des CatV et F et, de façon transitoire, l'activité de la CatS (Mihelic et al., 2008). On notera que le ratio d'expression des isoformes p31 et p41 varie selon le type cellulaire; p41 représente 10% du pool de la chaîne invariante dans les cellules B et 20 à 30% dans les macrophages et les CD4 (Koch et Harris, 1984; Pierre et Mellman, 1998). De ce fait, l'expression différentielle de p41 dans les CPA permettrait d'altérer l'activité des différentes protéases impliquées dans la dégradation des antigènes et de la chaîne invariante permettant la modulation de la présentation antigénique de classe II.

Des travaux plus récents ont démontré que l'expression de la chaîne invariante dans des souris corrèlent avec la présence de CMHII solubles dans le sérum (souris $li^{+/+}$ versus $li^{-/-}$) (Shishido et al., 2019). Ces mêmes travaux ont démontré que la présence de CMHII solubles dans le surnageant des cellules HEK293T augmente dramatiquement en fonction de l'expression de l'isoforme lip41 (en comparaison avec p31) (Shishido et al., 2019). Parallèlement, il a été observé qu'une présence accrue de CMHII solubles dans les surnageants des cellules B, des macrophages et des CD corrèle avec l'expression de p41 par ces cellules (MacKay et al., 2006). Étant donné que la présence de CMHII solubles est associée à la fois au maintien et à la suppression de la réponse immunitaire, leur rôle exact reste à clarifier (Nag et al., 1996; Marios-Frankiskos et al., 2010; Bakela et al., 2015).

3.4.1.3.3 Rôle de l'AEP dans la modulation de l'activité de la

CatL

Des études plus récentes sur l'AEP ont suggéré que cette protéase aurait un rôle supplémentaire à celui d'initier la dégradation de la chaîne invariante. Ces études suggèrent que l'accumulation de lip10 observée chez la souris lors de l'inhibition de l'AEP serait le résultat d'une activité indirecte de l'AEP sur la chaîne invariante (Maehr et al., 2005). Dans les cTECs, les auteurs démontrent que l'AEP est responsable de cliver la pro-CatL de manière à activer cette dernière permettant en retour à la CatL de cliver la chaîne invariante (Maehr et al., 2005).

3.4.2 Dégradation d'antigènes

La dégradation des antigènes internalisés par les CPAs s'effectue graduellement dans les différents compartiments du système endosomal. Cette dégradation permet de diversifier la nature des peptides présents dans les différents compartiments. Par conséquent, la nature des antigènes présentés aux cellules T varie en fonction de l'emplacement où les CMHII sont chargées d'un peptide (Villadangos et Ploegh, 2000). Leur protéolyse étant plus arbitraire que celle de la chaîne invariante, l'activité protéolytique qui s'applique est plus redondante et fait appel à diverses exopeptidases, endopeptidases et réductases (Villadangos et Ploegh, 2000). Notamment, la réductase thiol lysosomale induite à l'IFN γ (GILT) est impliquée dans le dépliement des protéines avec des ponts disulfures (Hsing et Rudensky, 2005). Il a été démontré que l'AEP, décrite plus haut, joue un rôle dans la dégradation de certains antigènes (Watts et al., 2005). En absence de l'AEP, la présentation des peptides antigéniques aux cellules T est ralentie (Watts et al., 2005). Bien que les lysosomes soient riches en protéases, aucune protéase ne s'est vue attribuée une fonction totalement non-redondante et essentielle dans la génération de peptides (Jensen, 2007).

3.4.3 HLA-DO et HLA-DM et le chargement des CMHII

HLA-DM est une molécule de classe II non classique (Denzin et al., 2005). Sa séquence possède 30% d'homologie à celle des molécules de classe II conventionnelles et, contrairement à ces dernières, démontre peu de polymorphismes, particulièrement dans la région correspondant à la poche de fixation (Denzin et al., 2005). Les structures cristallines

des CMHII et HLA-DM sont très similaires à l'exception de l'absence de peptides dans la poche de fixation de HLA-DM (Denzin et al., 2005).

Un motif basé sur la tyrosine (YxxΦ) au niveau de sa queue cytoplasmique permet à HLA-DM de s'accumuler dans les endosomes indépendamment de l'expression de la chaîne invariante (voir section 3.3.1) (Sanderson et al., 1994; Marks et al., 1995). Bien que HLA-DM s'accumule majoritairement dans les compartiments endosomaux, des études ont montré la présence de DM à la surface cellulaire de certaines cellules dendritiques et lymphocytes B (Arndt et al., 2000).

La fonction de DM est tripartite :

- DM catalyse le relâchement du peptide CLIP des complexes $\alpha\beta$ CLIP (Denzin et Cresswell, 1995; Sherman et al., 1995; Sloan et al., 1995)
- DM agit comme chaperon afin de stabiliser les CMHII non chargées (Denzin et al., 1996; Kropshofer et al., 1997) et
- DM module le répertoire des peptides présentés en catalysant l'échange de peptides à faible affinité pour des peptides à haute affinité dans la poche de fixation des molécules de classe II (Kropshofer et al., 1996; Weber et al., 1996).

En absence de la chaîne invariante et de HLA-DM, la formation de complexes pCMHII stables requiert jusqu'à plusieurs jours *in vitro* (Sadegh-Nasseri et al., 1994). En revanche, dans les cellules présentatrices d'antigènes où la chaîne invariante et HLA-DM sont

exprimées, ce même processus s'effectue en 1 à 3 heures (Cresswell, 1985; Neefjes et al., 1990).

Contrairement aux autres CMHII, selon des travaux effectués dans les années 80, seul l'expression de la chaîne HLA-DO α est induite en réponse à l'IFN γ ; pour cette raison, l'hétérodimère DO α /DO β a longtemps été considéré comme non fonctionnel (Tonnel et al., 1985). Or, l'homologie à plus de 80% qui existe entre la séquence humaine et murine semble indiquer le contraire (Denzin et al., 2005). En effet, des travaux subséquents ont démontré que l'IFN γ induit l'expression de la chaîne HLA-DO β dans des cellules de neuroblastome et dans des cellules HeLa (Ponzoni et al., 1993; Hake et al., 2003).

Tout comme HLA-DM, HLA-DO présente un faible niveau de polymorphismes, mais celui-ci possède jusqu'à 60% d'homologie avec les molécules de classe II conventionnelles (Trowsdale et Kelly, 1985; Servenius et al., 1987). Contrairement aux autres CMHII, HLA-DO est plus fortement exprimé dans les cellules B et les TECs (Karlsson et al., 1991).

Lorsqu'exprimées seules, les chaînes α et β de DO peinent à s'assembler et sortir du RE sous la forme de dimères DO α /DO β (Liljedahl et al., 1996). Toutefois, lorsqu'exprimées en présence de HLA-DM, les dimères DO sont secourus et sortent du RE sous la forme de complexes DO/DM ciblés aux compartiments MIICs (Liljedahl et al., 1996; Deshaies et al., 2005). HLA-DO a pour fonction d'inhiber HLA-DM (Denzin et al., 1997; Van Ham et al., 1997). Ainsi, l'expression de HLA-DO a pour effet d'augmenter le niveau de complexe CMHII-CLIP (Denzin et al., 1997; Van Ham et al., 1997). Il est à noter que différents allèles de HLA-DOB existent; ceci se traduit en une variabilité dans la capacité des dimères DO α /DO β formés

par ces différents allotypes à réguler le niveau des complexes CMHII-CLIPs (Denzin et al., 2017). Chez la souris, cette variabilité dans les allèles de H2-OB est associée à une disparité dans la production d'anticorps neutralisants contre des infections virales (Denzin et al., 2017).

3.5 Présentation aux cellules T CD4+

Une fois les CMHII chargées d'un peptide, les complexes pCMHII accèdent à la surface de manière à entrer en contact avec les TCRs des cellules T CD4+. Tel que déterminé suite à la visualisation de tubules dans les CDs, le transport des pCMHII à la surface cellulaire dépendrait de la transformation des vésicules où ils se trouvent en structures tubulaires qui seraient dirigées vers des sous-domaines membranaires spécialisés (Vyas et al., 2008; Berger et Roche, 2009). Ainsi, ces tubules permettraient de cibler et de regrouper les pCMHII aux sites d'interactions avec les cellules T ce qui contribuerait à la formation de la synapse immunologique (Vyas et al., 2008; Berger et Roche, 2009). De plus, il est possible d'observer l'accumulation de pCMHII au niveau de radeaux lipidiques ou de régions riches en tétraspanines (Vyas et al., 2008). De manière intéressante, lorsque l'intégrité des radeaux lipidiques est compromise dans les CPAs, il en résulte un défaut d'activation des cellules T (Anderson et al., 2000; Berger et Roche, 2009). Ceci suggère un rôle de ces domaines membranaires dans la présentation antigénique et un rôle du regroupement des pCMHII dans l'activation des cellules T (Anderson et al., 2000; Berger et Roche, 2009). Or, il

a été démontré que le regroupement des TCRs est un événement important dans la reconnaissance de l'antigène et l'activation des cellules T (Fooksman, 2014).

4 La chaîne invariante et ses autres fonctions

4.1 La chaîne invariante et la maturation des cellules B

Jusqu'à la fin des années 1990, les fonctions attribuées à la chaîne invariante étaient principalement reliées à son rôle de chaperon dans la présentation antigénique de classe II. Des études plus récentes en ont suggéré autrement suite à l'observation dans la souris $Ii^{-/-}$ d'un défaut de maturation des cellules B caractérisé par une incapacité à réguler à la hausse les IgD et le CD23 (Shachar et Flavell, 1996). Des études subséquentes ont démontré que la présence d'un transgène encodant la partie en N-terminale de la chaîne invariante (aa 1-82) est suffisante pour rétablir la maturation des cellules B transitoire du stade TI à TII dans une souris homozygote $Ii^{1-82/1-82}$ (figure 7) (Matza et al., 2002b). Cependant, l'expression de ce transgène ne suffit pas à rétablir l'expression des CMHII en surface; ceci suggère un nouveau rôle de la chaîne invariante dans la maturation des lymphocytes B non imputable à sa fonction de chaperon pour les CMHII (Matza et al., 2002b). Selon ces travaux, la chaîne invariante serait capable d'initier une cascade de signalisation résultant en une translocation au noyau et l'activation du facteur de transcription NF- κ B p65/RelA dépendant de TAT_{II}105 (figure 7 #1)(Matza et al., 2001). L'initiation de la transcription par NF- κ B dépend du clivage de la chaîne invariante au niveau de son domaine transmembranaire et du relargage de la membrane du fragment Ii^{1-42} (Matza et al., 2002a). Le fragment Ii^{1-42} , une fois relâché de la membrane, migre vers le noyau où il se lie au facteur de transcription NF- κ B (p65/RelA) et au facteur de transcription relié à Runt (RUNX) (figure 7 #1) (Becker-Herman et al., 2005; Gil-Yarom et al., 2017). Une

fois lié à ces facteurs de transcription NF- κ B et RUNX, le fragment de la chaîne invariante agit à titre de régulateur de la transcription pour des gènes associés à la régulation de la réponse immunitaire et à la survie cellulaire (Gil-Yarom et al., 2017). Enfin, Matza *et al*, identifient un signal de destruction (RXXL) à l'extrémité C-terminale de Ii¹⁻⁴²; celui-ci permettrait d'inactiver rapidement Ii¹⁻⁴² par clivage (Matza et al., 2002a). La mutation de ce motif engendre une activation soutenue de NF- κ B et la maturation de cellules B (Matza et al., 2002a).

Dans le but de réguler l'activité des facteurs de transcription, ceux-ci sont fréquemment maintenus sous une forme dormante. Suite à une stimulation quelconque, ces facteurs peuvent subséquemment être activés. Une stratégie nouvellement découverte ferait en sorte de conserver dans un état dormant ces facteurs de transcriptions ancrés à la membrane. Suite à une protéolyse intramembranaire régulée (RIP), le facteur de transcription ancré à la membrane est relâché et par conséquent activé. Quelques propriétés du clivage intramembranaire de la chaîne invariante rappellent certaines des particularités de la protéolyse de type RIP. Notamment, le clivage de type RIP dépend de la dégradation au préalable du domaine luminal de la protéine ciblée à moins de 30 aa de la membrane (Becker-Herman et al., 2005). Ceci est observé lors de la protéolyse de la chaîne invariante dans les endosomes (figure 7). Il a été démontré que le fragment Ii¹⁻⁸², représentant un produit de clivage de la chaîne invariante, est plus efficace pour engager la maturation des cellules B que la forme sauvage de la chaîne invariante (216aa) (Matza et al., 2002a). De plus, la mutation dans le domaine transmembranaire des aa 42-44 a pour

effet de bloquer complètement la protéolyse intramembranaire de la chaîne, l'activation de NF- κ B et la différenciation des cellules B.

Le clivage intramembranaire de type RIP est effectué par les protéases clivant au niveau du domaine transmembranaire et s'opère exclusivement dans les compartiments endosomaux (Urban et Freeman, 2002; Weihofen et Martoglio, 2003; Lemberg et Martoglio, 2004). Des études récentes ont identifié une de ces protéases, la peptidase à signal peptidique 2a (Sppl2a), spécifique aux protéines membranaires de type II impliquée dans le clivage de la chaîne invariante (figure 7 #2) (Schneppenheim et al., 2013). Cette protéase est capable de cliver le fragment lip8 en lip4 et est nécessaire à la survie des cellules B et des cellules dendritiques (Beisner et al., 2013). Or, les auteurs démontrent qu'en absence de Sppl2a, l'accumulation de lip8 membranaire est toxique et engendre la mort de ces cellules alors que le clivage de la chaîne invariante par cette même protéase est nécessaire au développement des cellules B, comme ce fut initialement observé dans les travaux de Shachar (Beisner et al., 2013). Cependant, il a été démontré que chez des souris doubles déficientes pour la chaîne invariante et CMHII, la maturation des cellules B est restaurée (Maehr et al., 2004). Ceci suggère que ni la chaîne invariante, ni les CMHII ne sont essentielles au développement des cellules B. Ce qui est plus, il a été démontré que le développement des cellules B de souris *sppl2^{-/-}* est arrêté au stade T1, tel qu'initialement observé chez la souris *li^{-/-}* alors que chez des souris double KO (*sppl2^{-/-}* et *li^{-/-}*), le développement des cellules B est restauré (Schneppenheim et al., 2013). De ce fait, ces études semblent remettre en question l'implication de la chaîne invariante dans la maturation des cellules B (Schneppenheim et al., 2013). Des travaux subséquents ont

finalement démontré qu'une accumulation non contrôlée du fragment li^{1-82} est associée à un défaut dans la voie de signalisation du BCR et un défaut dans la maturation des cellules B (Schneppenheim et al., 2017). Ainsi une dégradation complète de la chaîne invariante est nécessaire à la maturation des cellules B (Schneppenheim et al., 2017).

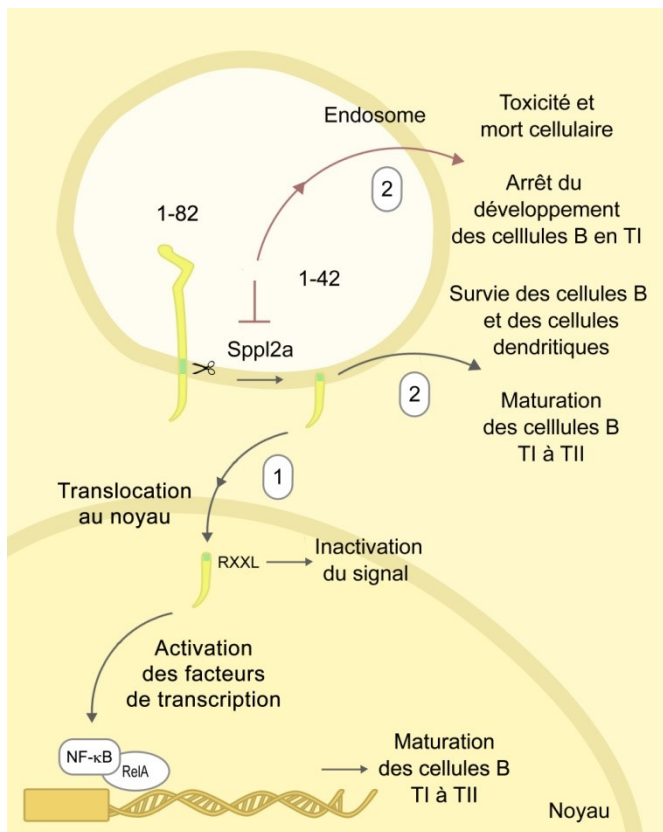


Figure 7: Implication de la chaîne invariante dans le développement des cellules B.

Le peptide li^{1-82} est généré par une série de clivages de la chaîne invariante décrite dans la figure 5. Dans les endosomes, le peptide li^{1-42} est généré par clivage au niveau du domaine transmembranaire par Sppl2a. **1.** Ce fragment li^{1-42} migre vers le noyau où il active le facteur de transcription NF- κ B menant à la maturation des cellules B. La présence d'un motif de clivage RXXL à l'extrémité C-terminale du fragment li^{1-42} permet l'inactivation du signal. **2.** Le clivage de li^{1-82} en li^{1-42} assure la survie et la maturation

des cellules B et des CD. L'absence de Sppl2a résulte en une accumulation toxique du fragment li^{1-82} qui engendre la mort cellulaire et l'arrêt du développement des cellules B (flèches 2 rouge).

4.2 CD74, le récepteur de MIF et de *H. pylori*

Une petite fraction (2-5%) de la chaîne invariante est modifiée par l'addition de chondroïtine sulfate et exprimée rapidement à la surface cellulaire (Sant et al., 1985; Arneson et Miller, 2007). Ce serait sous cette forme que la chaîne invariante (Ii-CS – la chaîne invariante portant une modification chondroïtine sulfate) occupe le rôle de récepteur du facteur inhibiteur de la migration des macrophages (MIF) (Leng et al., 2003) en plus de lier *Helicobacter pylori* à la surface des cellules épithéliales gastriques (Beswick et al., 2005a).

4.2.1 Récepteur de MIF

MIF est l'une des toutes premières cytokines à avoir été décrites. Sa découverte remonte aux années 1960s; MIF est alors identifié comme étant un facteur soluble dérivé des cellules T (Bloom et Bennett, 1966; David, 1966). Sa forme active est un homotrimère capable de promouvoir l'activation des monocytes et des macrophages, résultant en une augmentation de leur activité phagocytaire (Sun et al., 1996; Leng et al., 2003; Reidy et al., 2013). Au demeurant, MIF est nécessaire à une expression optimale de $\text{TNF}\alpha$, d'IL-1 et de prostaglandine E_2 (PGE_2) associés entre autres à la prolifération et la différenciation cellulaire ainsi qu'à l'inflammation (Leng et al., 2003). MIF possède ainsi des activités pro-inflammatoires et immunorégulatrices importantes et est impliqué dans la pathogénèse de multiples maladies inflammatoires et auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde, le diabète et la sclérose en plaques (El-Turk et al., 2008).

Bien que la découverte de MIF remonte aux années 1960s, l'identité de son récepteur reste indéterminée jusqu'au début des années 2000s. En 2003, à l'aide d'une banque d'expression d'ADNc provenant de monocytes activés, Leng *et al.*, identifient une interaction de haute affinité entre MIF et CD74 (figure 8)(Leng et al., 2003). L'activation des macrophages par MIF résulte en une activité soutenue des protéines kinases activées par des agents mitogènes (MAP), nommément les kinases régulées par des signaux extracellulaires 1 et 2 (ERK-1/2). Les auteurs démontrent que la cytokine induit la phosphorylation des MAP kinases ERK-1/2 et subséquemment la production de PGE2 dans des macrophages dérivés de souris $li^{+/+}$ (Leng et al., 2003). Lorsque ces expériences sont répétées dans des macrophages provenant de souris $li^{-/-}$, MIF ne parvient pas à induire la phosphorylation des kinases et la production de PGE2 est abolie (Leng et al., 2003). Un autre groupe de recherche démontre que MIF active la voie de la phosphoinositide 3 kinase/protéine kinase B (PI3K/Akt) de manière dépendante à CD74/c-Src dans des lignées de fibroblastes; l'activation de celle-ci a pour effet de promouvoir la survie cellulaire (Lue et al., 2007). De même, dans les cellules B, la liaison de MIF à CD74 active cette même voie PI3K/AKT et résulte en la prolifération ainsi la survie de ces cellules (Gore et al., 2008). Mis ensemble, ces travaux suggèrent un rôle de MIF dans la survie des cellules immunes innées et adaptatives ainsi que le rôle clé de la chaîne invariante dans ces phénomènes (Gore et al., 2008).

4.2.1.1 CD74/CD44 récepteur de MIF

La capacité de CD74 à signaler serait inhérente à son interaction avec CD44, une protéine polymorphique transmembranaire possédant une activité tyrosine kinase et dont l'expression est largement répandue (Leng et al., 2003; Gore et al., 2008). Bien que CD74 soit suffisante à la liaison de MIF, la présence de CD44 est nécessaire à l'activation des voies de signalisation (Shi et al., 2006). Ainsi, suivant la liaison de MIF à son récepteur CD74, le corécepteur CD44 phosphoryle la kinase c-Src, qui en retour est nécessaire à l'activation des voies MAP kinases et Akt/PI3K (figure 8 #1)(Shi et al., 2006; Lue et al., 2007; Gore et al., 2008). Cette aptitude de la chaîne invariante à signaler est totalement indépendante de son rôle de chaperon et serait inhibée par une interaction avec les molécules du CMHII (Benedek et al., 2013; Meza-Romero et al., 2014).

On notera que MIF et CD74 ont tous deux été impliqués dans la progression des tumeurs (Gore et al., 2008). La surexpression de MIF est observée dans des tumeurs solides et impliquée dans la croissance de cellules malignes (Meyer-Siegler et Hudson, 1996; Bando et al., 2002; Nishihira et al., 2003). De même, la surexpression de CD74 est observée dans plusieurs cancers et a été proposée comme marqueur pronostique de cancer (Lazova et al., 1997; Ishigami et al., 2001; Meyer-Siegler et al., 2004). Un exemple de l'implication de MIF et CD74 est illustré dans des cellules B provenant de patients avec une leucémie lymphoïde chronique (B-CLL) (Binsky et al., 2007). Ces cellules sont caractérisées par une surexpression en surface de CD74 (Binsky et al., 2007). Dans les B-CLLs, l'activation de CD74 à la surface cellulaire par MIF résulte en la production et la sécrétion d'IL-8 (Binsky et al., 2007). L'IL-8 régule à son tour sa propre expression de manière autocrine et active la voie

PI3K/Akt par la phosphorylation de Akt (Binsky et al., 2007). L'activation de la voie PI3K/AkT résulte en l'expression de Bcl-2 (protéine anti-apoptotique 2 associée aux lymphomes de cellules B) qui engendre la survie des cellules cancéreuses (Binsky et al., 2007). Parallèlement, il a été démontré que le couple CD74/CD44 agit aussi comme récepteur de MIF à la surface des cellules épithéliales intestinales où CD74 est surexprimée et agirait comme régulateur de la survie des cellules tumorales colorectales (Maharshak et al., 2010).

4.2.1.2 CD74/CXCR récepteur de MIF

En plus de s'associer à CD44 à la surface cellulaire, il a été démontré que CD74 s'associe au récepteur de chimiokine CXC 2 (CXCR2), un récepteur de IL-8 communément exprimé sur les monocytes, les neutrophiles et les leucocytes (Bernhagen et al., 2007; Beswick et Reyes, 2009). Par lui-même, CXCR2 peut agir comme récepteur de MIF, dont le monomère est structurellement semblable au dimère d'IL-8, et assure la fonction de migration de ces cellules (Bernhagen et al., 2007). Selon les travaux de Bernhagen *et al*, la présence de complexes CD74/CXCR2 à la surface des monocytes augmenterait l'activation des protéines G couplées à un récepteur (GPCR) associées à CXCR2, ce qui aurait pour effet d'amplifier le recrutement de ces cellules au site d'inflammation (figure 8 #2)(Bernhagen et al., 2007). En revanche, l'absence de CD74 chez les neutrophiles pourrait expliquer le recrutement modéré de ces cellules en réponse à une stimulation par MIF (Bernhagen et al., 2007).

En parallèle, il a été démontré que CD74 peut aussi s'associer à CXCR4 (Schwartz et al., 2009). CXCR4 est un récepteur de la chimiokine CXCL12 exprimé à la surface des cellules T (Schwartz et al., 2009). L'axe CXCL12/CXCR4 est impliqué dans divers processus dont la migration, l'homéostasie, l'inflammation et le recrutement des cellules T (Schwartz et al., 2009). Les auteurs démontrent que l'interaction de MIF avec le complexe CD74/CXCR4 induit l'activation de Akt dans les lymphocytes T et le recrutement de celles-ci (figure 8 #2)(Schwartz et al., 2009). Somme toute, les complexes CD74/CXCR2 et CD74/CXCR4 restent encore peu caractérisés et il est encore indéterminé si la participation de CD44 est requise ou non à la signalisation.

Deux types d'activation des Erk kinases sont observées suites à la stimulation par MIF : la première étant une activation rapide des Erk kinases de manière CD74-CD44 dépendante alors que la seconde, décrite par les travaux de Xie *et al*, résulte en une activation soutenue de cette voie (Xie et al., 2011). Selon ces travaux, l'internalisation de MIF est dépendante de CD74 dans les macrophages et colocalise partiellement avec CXCR2. Les auteurs démontrent que lors de la stimulation par MIF, β -arrestine 1 lie CD74, provoque l'endocytose de MIF/CD74 et agit comme échafaudage permettant le recrutement de composantes de la voie Erk kinases et une activation soutenue de cette dernière (Xie et al., 2011). En 2012, Schwartz *et al*, démontrent que l'internalisation de MIF par CXCR4 dépend de la clathrine et de la dynamine et que celle-ci est accélérée par la présence de CD74 (Schwartz et al., 2012). L'endocytose de MIF par CXCR4/CD74, facilitée par la β -arrestine, active la voie Akt dans ces cellules (Schwartz et al., 2012).

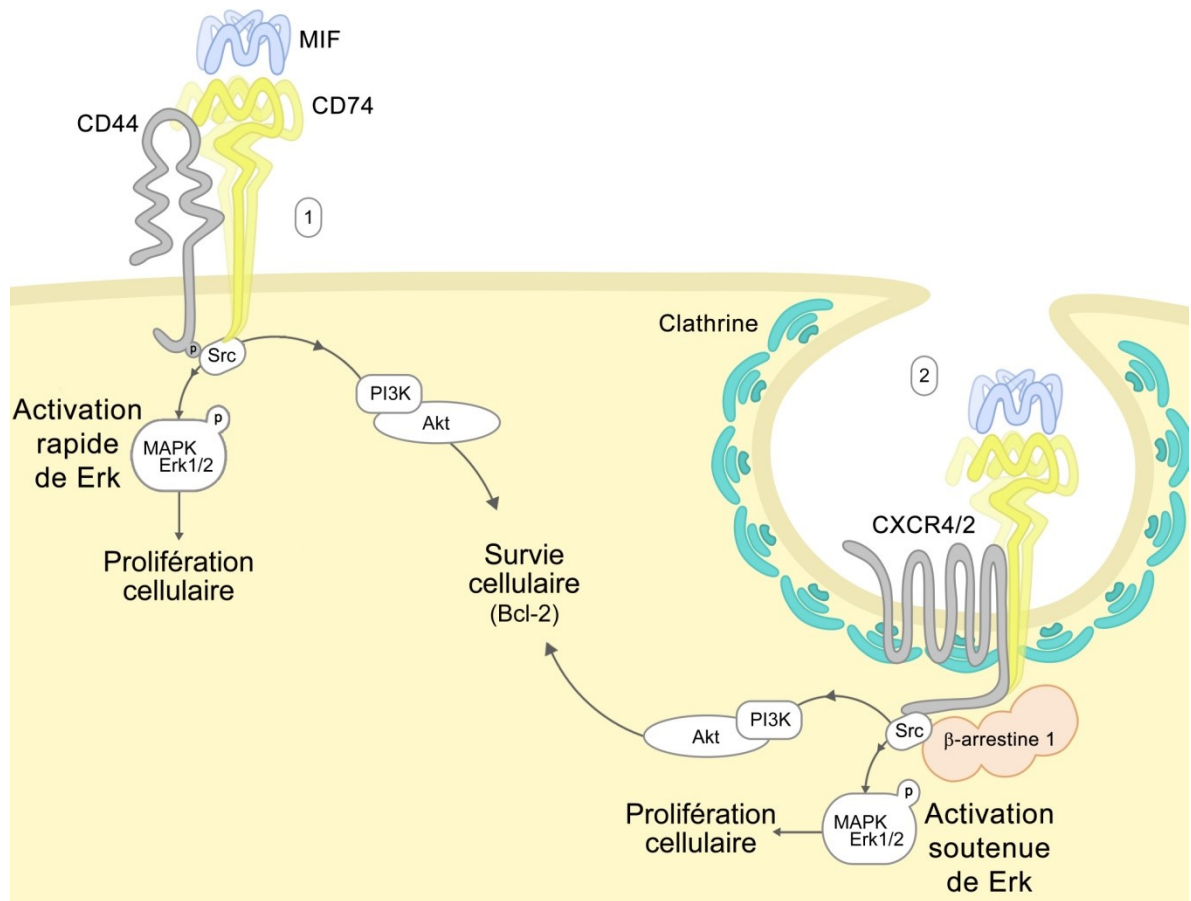


Figure 8: CD74, récepteur de la cytokine MIF.

1. Récepteur CD74/CD44 de MIF. Suite à la liaison de MIF (bleu) à son récepteur CD74 (jaune), le corécepteur CD44 (gris) active la kinase c-Src par phosphorylation. c-Src active en retour les voies de signalisation PI3K/Akt et MAPK/Erk1/2. La voie PI3K/Akt assure la survie cellulaire en partie par la production de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et la voie MAPK/Erk1/2 assure la prolifération cellulaire. **2.** Récepteur CD74/CXCR de MIF. Suite à la liaison de MIF au récepteur CD74 associé au corécepteur CXCR2 ou CXCR4 (gris), la β-arrestine 1 (rouge) est recrutée au complexe. Cette dernière facilite l'internalisation du complexe par des vésicules de clathrines (bleu). Une fois internalisé, le complexe active la kinase c-Src qui active à la fois la voie PI3K/Akt et d'une manière soutenue la voie MAPK/Erk1/2 permettant la survie et la prolifération cellulaire.

4.2.2 Récepteur de *Helicobacter pylori*

En plus d'être exprimée par les cellules présentatrices d'antigènes, CD74 est exprimée à la membrane apicale des cellules épithéliales gastriques (Barrera et al., 2005). À la surface de ces cellules gastriques intestinales, CD74 sert de point d'adhésion à *H. pylori*, une bactérie gram négative (Beswick et al., 2005a; Beswick et Reyes, 2009). Cette bactérie colonise la muqueuse gastroduodénale chez l'humain et représente un acteur majeur associé aux gastrites chroniques, à la formation d'ulcères et au développement de carcinomes et lymphomes gastriques (Beswick et al., 2005a; Beswick et Reyes, 2009). De ce fait *H. pylori* a été classée comme carcinogène de classe I par le Centre International de Recherche sur le Cancer (Beswick et Reyes, 2009). Un contingent de molécules incluant des carbohydrates et des lysophospholipides sont capables de lier la bactérie (Beswick et Reyes, 2009). Sachant que *H. pylori* lie des glycoconjugués, il reste à déterminer si la bactérie lie la forme li-CS de CD74 (Beswick et Reyes, 2009). La liaison de *H. pylori* à CD74 dépend de la protéine uréase exprimée à sa surface (Beswick et al., 2006a; Beswick et Reyes, 2009). Comme l'uréase est exprimée à la surface de nombreuses bactéries, cette protéine pourrait faciliter l'adhésion de certaines de celles-ci aux cellules exprimant CD74 (Beswick et Reyes, 2009). Suite à la liaison de *H. pylori* à CD74, NF- κ B est activée et provoque la production de cytokines pro-inflammatoires, dont l'IL-8 (figure 9 #1) (Beswick et al., 2005a). L'adhésion de *H. pylori* aux cellules épithéliales gastriques augmente par voie autocrine l'expression en surface de CD74 et des récepteurs à l'IL-8 : CXCR1 et CXCR2 (figure 9 #2)(Beswick et al., 2005b; Beswick et Reyes, 2009). Le blocage des récepteurs CXCR1 et CXCR2 ou la

neutralisation de l'IL-8 inhibent l'augmentation de l'expression de CD74 (Beswick et al., 2005b). En plus de la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-8, l'infection des cellules épithéliales gastriques par *H. pylori* provoquerait également la production de MIF (figure 9 #3)(Beswick et al., 2006b). L'augmentation de la production de MIF associée à la survie cellulaire et de l'expression en surface de ses récepteurs CD74 et CXCR2 dans les cellules épithéliales gastriques suite à une infection par *H. pylori* met en lumière le rôle de cette bactérie dans l'inflammation gastrique et la carcinogénèse (Beswick et Reyes, 2009; Maharshak et al., 2010). L'expression de CD74 sur des cellules cancéreuses issues du colon et la corrélation entre son niveau d'expression et le grade associé à la tumeur met en évidence un rôle de CD74 dans les cancers colorectaux (Maharshak et al., 2010).

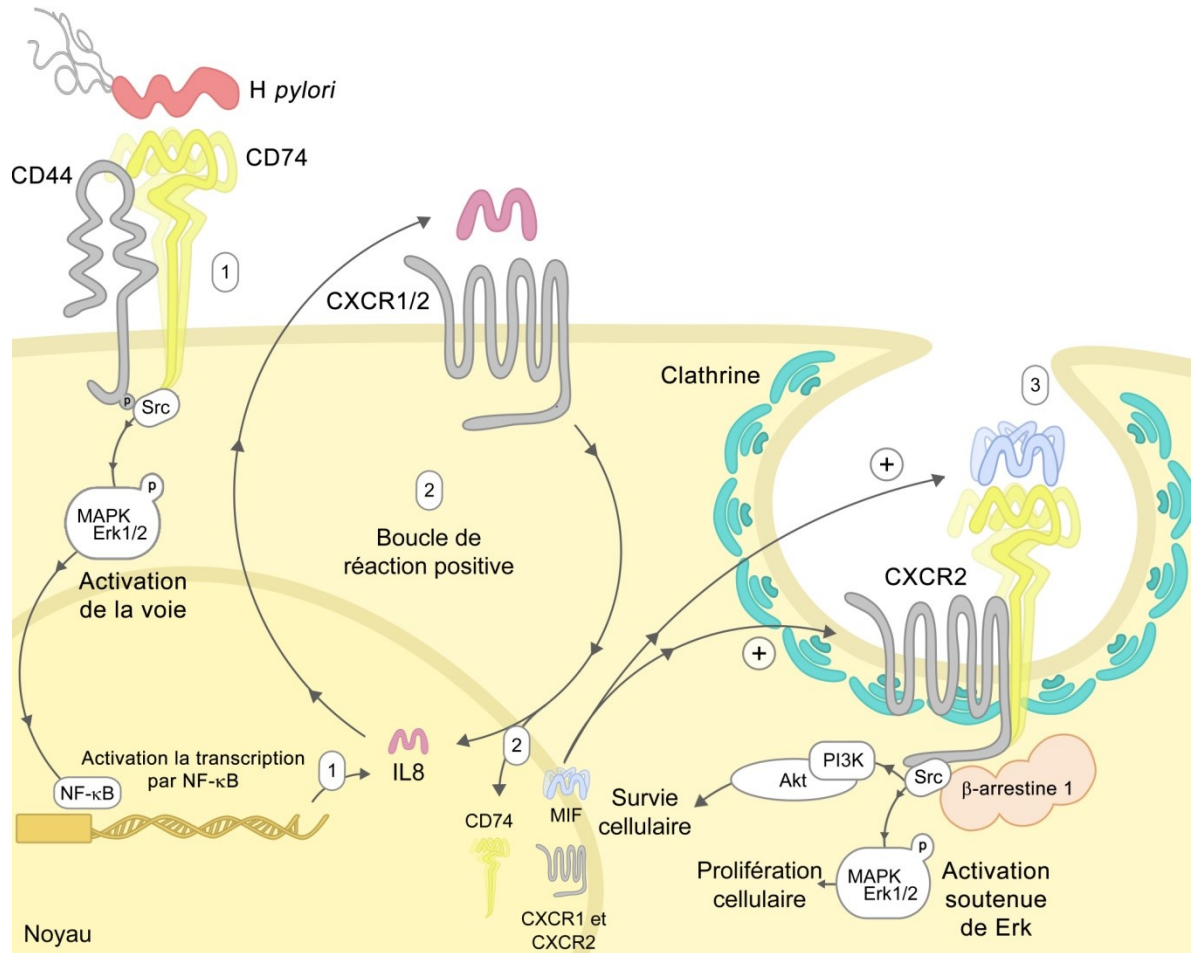


Figure 9: CD74, récepteur de *H. pylori*.

1. *H. pylori* (rouge) adhère à CD74 (jaune) exprimée à la surface des cellules épithéliales gastriques. Via le corécepteur CD44 (gris), la voie de signalisation MAPK/Erk1/2 est activée, résultant en la production des cytokines IL-8 (mauve), MIF (bleu) et des récepteurs CD74, CXCR1 et CXCR2 (gris). 2. L'IL-8 produite lie les récepteurs CXCR1 et CXCR2, ce qui active une boucle de réaction positive permettant la production d'IL-8 et de CD74. 3. MIF lie le récepteur CD74 associé au corécepteur CXCR2 (gris) et la β -arrestine 1 (rouge) est recrutée au complexe. La β -arrestine 1 facilite l'internalisation du complexe par des vésicules de clathrines (bleu). Une fois internalisée le complexe active la kinase c-Src. La c-Src active par la suite la voie PI3K/Akt et d'une manière soutenue la voie MAPK/Erk1/2 permettant la survie et la prolifération cellulaire, respectivement.

5 Le trafic de l'isoforme p35 de la chaîne invariante

5.1 Motifs de rétention au RE

5.1.1 Le motif di-lysines, KKXX

Afin d'assurer l'intégrité fonctionnelle du RE, des protéines, dites résidentes, requièrent d'être retenues définitivement dans cette organelle. D'autre part, afin d'assurer le bon assemblage de complexes multiprotéiques, certaines des sous-unités faisant partie de ces complexes sont retenues temporairement au RE. Dans le but de retenir les protéines au RE, il existe différents motifs de rétention soit pour les protéines solubles (motif KDEL) ou les protéines transmembranaires, ainsi que plusieurs stratégies par lesquelles résulte cette rétention. Présent à l'extrémité C-terminale des queues cytoplasmiques des protéines transmembranaires de type I, le motif di-lysines est le plus documenté des motifs associés aux protéines non solubles. En comparant la séquence à l'extrémité C-terminale de queues cytoplasmiques de protéines transmembranaires de type I localisées ou non au RE, et par mutagenèse dirigée, Jackson *et al.*, ont originellement déduit en 1990 une séquence consensus basée sur un duo de lysines (Jackson *et al.*, 1990). Cette séquence se compose d'une première lysine à la position 3 du C-terminale et d'une seconde à la position 4 ou 5, ce qui lui valut le nom de motif « di-lysines » (KKXX ou KXKXX, où « X » est n'importe que aa) (Jackson *et al.*, 1990; Pelham, 1995). La présence de prolines ou glycines au pourtour de ces lysines peut perturber la rétention au RE, alors que celle de résidus sérines ou alanines augmente leur efficacité. La position relative à la membrane du motif est d'au minimum de 5 acides aminés du domaine transmembranaire. Toutefois, comme observée chez la 3-

hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase humaine, ce motif peut se trouver à plusieurs centaines d'aa du domaine transmembranaire (Luskey et Stevens, 1985).

Il existe deux mécanismes singuliers, engageant des machineries cellulaires distinctes, responsable de la rétention au RE. Le premier mécanisme suggère une exclusion de ces protéines des sites de sortie du RE (ERES). Le second dépend d'un recyclage au RE de ces protéines par les vésicules COP de type I (COPI – « COat Protein type I ») à partir du cis-Golgi. Le modèle prévalant de la rétention au RE par le motif KKXX repose sur le recyclage dépendant des vésicules COPI à partir du cis-Golgi (Andersson et al., 1999). En effet, bien que localisées au RE, les protéines chimériques possédant un motif di-lysines présentent des modifications de leur glycosylation indicatif d'un passage par l'appareil de Golgi ; ceci suggère une localisation de ces chimères au RE qui résulte d'un recyclage à partir de l'appareil de Golgi (Jackson et al., 1993; Gaynor et al., 1994; Martire et al., 1996). L'inactivation du transport COPI résulte en une redistribution post-cis-Golgi des molécules à motifs di-lysines (Letourneur et al., 1994). De plus, il a été démontré que les motifs di-lysines fonctionnels interagissent avec les complexes protéiques COPI qui recouvrent les vésicules chargées du transport rétrograde de l'appareil de Golgi au RE (Cosson et Letourneur, 1994; Letourneur et al., 1994; Gaynor et Emr, 1997). Ces complexes COPI sont composés de 7 sous-unités α , β , β' , γ , δ , ε et ζ (Gaynor et Emr, 1997) (figure 10). Toutefois, l'identité de la sous-unité du complexes COPI responsable de l'interaction avec les motifs di-lysines reste nébuleuse. Différentes études pointent en direction d'une interaction avec le domaine WD40 des sous-unités α et β' (Letourneur et al., 1994; Zerangue et al., 2001;

Eugster et al., 2004) ou d'une interaction avec la sous-unité γ (Harter et al., 1996; Harter et Wieland, 1998).

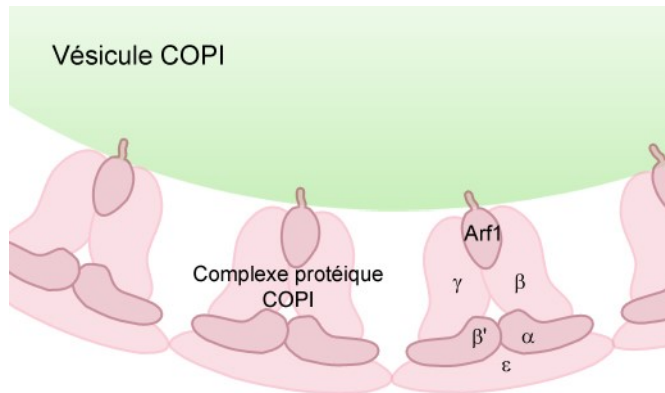


Figure 10: Composition des vésicules COPI.

Les vésicules COPI sont chargées du transport rétrograde de l'appareil de Golgi au RE. Ces vésicules sont recouvertes de 7 sous-unités qui forment ces complexes protéiques: α , β , β' , γ , δ , ϵ et ζ . Arf 1, une enzyme responsable de

l'hydrolyse de la guanosine triphosphate (GTPase), recrute ce complexe à la membrane et permet la formation des vésicules.

La protéine 53 associée au compartiment intermédiaire entre le RE et l'appareil de Golgi (ERGIC53) est souvent utilisée comme protéine référence pour le recyclage au RE à partir de l'appareil de Golgi grâce à son motif di-lysines KKFF (Andersson et al., 1999). Toutefois, pour certaines protéines à motif di-lysines, leur localisation au RE résulte d'une rétention absolue dans ce compartiment comme observé pour la protéine chimérique CD4KKAA. Ainsi les deux modèles de rétention au RE semble possible pour les protéines possédant un motif di-lysines (Andersson et al., 1999).

5.1.2 L'isoforme p35 et son motif di-arginine RXR

Un second motif de rétention, initialement décrit chez les protéines transmembranaires de type II, est le motif di-arginine (Schutze et al., 1994; Teasdale et Jackson, 1996). En 1990, ce motif est identifié dans la queue cytoplasmique de l'isoforme p35 de la chaîne invariante (figure 11) (Lotteau et al., 1990; Marks et al., 1990). En l'absence de CMHII, les trimères de la chaîne invariante possédant au moins une copie de l'isoforme p35 sont localisés au RE (Schutze et al., 1994). Ce motif est communément composé de deux ou plus arginines juxtaposées, ou séparées par un acide aminé (Schutze et al., 1994). La présence de plus de deux arginines se traduit en une plus forte rétention au RE, alors que la présence d'acides aminés chargés négativement est associée à l'inhibition du motif. En 1994, on souligne l'importance de sa localisation à proximité de l'extrémité N-terminale (Schutze et al., 1994). Or, le motif RXR de rétention est beaucoup plus courant qu'initialement proposé et, contrairement au motif KKXX, n'est pas essentiellement localisé à proximité de l'extrémité N-terminale (Michelsen et al., 2005). On le retrouve non seulement dans la queue cytoplasmique des protéines transmembranaires de type II mais aussi chez les protéines transmembranaires de type I (Meyer et Radsak, 2000) ainsi que dans les domaines cytoplasmiques des protéines membranaires polytopiques (Zerangue et al., 1999; Margeta-Mitrovic et al., 2000).

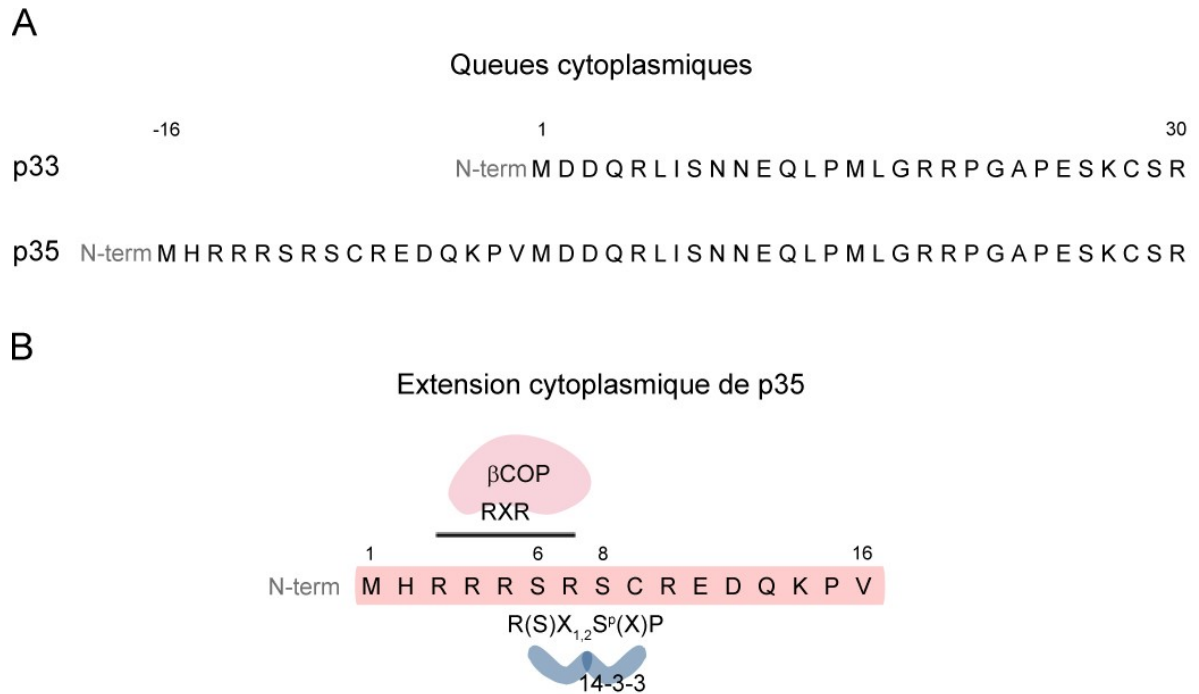


Figure 11: Séquences protéiques des domaines cytoplasmiques des isoformes p33 et p35.

(A) Alignement des séquences des queues cytoplasmiques des isoformes p33 et p35. La queue cytoplasmique de p35 possède une extension de 16 aa à l'extrémité N-terminale résultant de l'utilisation d'un codon initiation alternatif. **(B)** Séquence de l'extension cytoplasmique de l'isoforme p35 illustrant les différents motifs d'interaction. Le motif RXR surligné interagit à la sous-unité β COP (rose) des complexes protéiques COPI, ce qui permet la rétention de l'isoforme dans le RE. Les sérines 6 et 8 sont phosphorylées par PKC. La phosphorylation de la sérine 8 est requise à la sortie de l'isoforme du ER. 14-3-3 (bleu) lie une séquence chevauchant le motif RXR et les sérines.

5.2 Rétention au ER par les vésicules COPI

Contrairement aux motifs KKXX, dont la fonction nécessite une localisation spécifique par rapport à la membrane et un positionnement à l'extrémité C-terminale, les motifs RXR sont positionnés de manière beaucoup plus aléatoire (Schutze et al., 1994; Zerangue et al., 1999; Shikano et Li, 2003). Comme la disposition de ces motifs de rétention

par rapport à la membrane diffère, il est vraisemblable que l'interaction entre ces motifs et les complexes protéiques COPI varie d'une protéine à l'autre (Shikano et Li, 2003). La propension des complexes COPI à interagir avec différents motifs RXR a été mise en évidence pour différentes protéines :

- les deux sous-unités formant les canaux potassiques KCNK3 et KCNK9 (O'Kelly et al., 2002),
- les isoformes p35 et p43 de la chaîne invariante (O'Kelly et al., 2002),
- la sous-unité $\alpha 4$ du récepteur neuronal d'acétylcholine nicotinique (nAChR) (O'Kelly et al., 2002),
- la sous-unité Kir6.2 du canal potassique dépendant de l'ATP (K_{ATP}) (Yuan et al., 2003) et
- la sous-unité GB1 du neurotransmetteur de l'acide gamma-aminobutyrique de type B (GABA_B) (Brock et al., 2005).

Dans les travaux d'O'Kelly *et al.*, en 2002, lors d'essais d'interactions peptidiques, les auteurs démontrent une interaction entre la sous-unité β des vésicules COPI (β COP) isolée de cerveau de rat et des peptides correspondant aux domaines cytoplasmiques renfermant les motifs RXR de KCNK3, KCNK9, de la sous-unité $\alpha 4$ du récepteur nAChR et de l'isoforme p35 (figure 11B et 12) (O'Kelly et al., 2002). En 2007, Michelsen *et al.*, utilisent un système double-hybride chez la levure et une protéine membranaire rapporteuse possédant un

motif RXR dans le but d'identifier les sous-unités COPI responsables du transport rétrograde (Michelsen et al., 2007). Ces travaux mènent à l'identification des sous-unités β -et δ -COP; toutes deux nécessaires et suffisantes à la reconnaissance de motifs RXR et au transport rétrograde des protéines au RE possédant le motif (Michelsen et al., 2007).

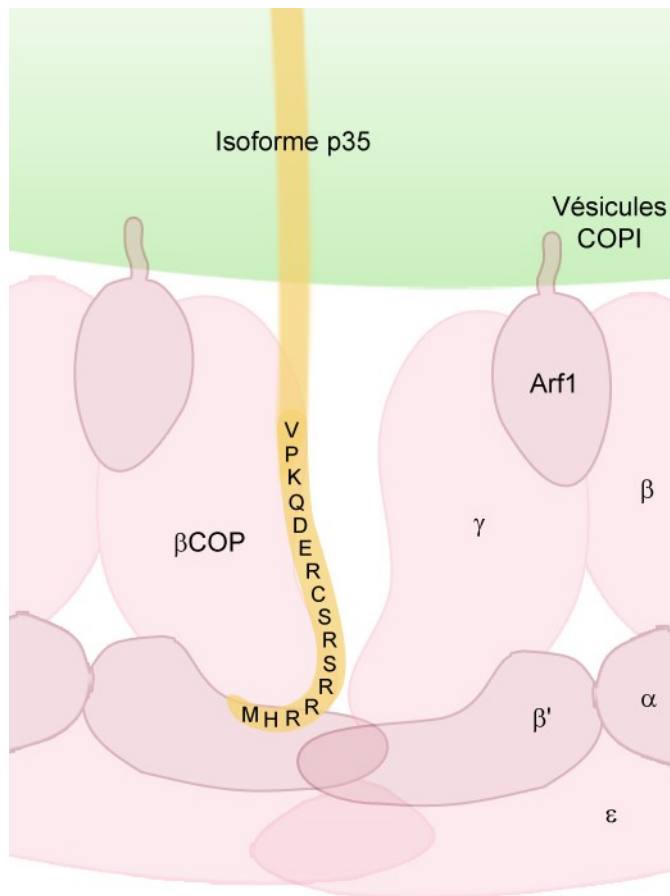


Figure 12: Transport rétrograde de l'isoforme p35 par les vésicules COPI.

Le motif RXR de la queue cytoplasmique de p35 (orange) interagit avec la sous-unité β COP des complexes protéiques COPI. Cette interaction permet à l'isoforme p35 d'être redirigée au RE.

5.3 Masquage du motif RXR de l'isoforme p35

Un caractère distinctif du motif RXR est sa présence caractéristique au sein des sous-unités protéiques formant des complexes multimériques membranaires et qui sont destinés à quitter le RE (Zerangue et al., 1999; Margeta-Mitrovic et al., 2000; Standley et al., 2000). Étant donné que l'assemblage d'un complexe protéique est un prérequis à son transport antérograde, on suggère que la présence d'un motif RXR dans les sous-unités de ces complexes agit à titre de contrôle de qualité intrinsèque. Ceci soulève la question du mode d'inactivation du motif suite à l'assemblage des complexes protéiques permettant aux protéines de quitter le RE définitivement. Plusieurs modèles d'inactivation du motif de rétention ont été identifiés:

- le masquage stérique suivant le bon assemblage des sous-unités protéiques formant les complexes (Margeta-Mitrovic et al., 2000),
- l'interférence du signal par la liaison de 14-3-3 (O'Kelly et al., 2002; Yuan et al., 2003; Heusser et al., 2006; Mrowiec et Schwappach, 2006),
- l'interférence du signal par la liaison du domaine d'interaction PDZ (Standley et al., 2000) ou encore
- l'interférence du signal par la phosphorylation (Kuwana et al., 1998; Scott et al., 2001; Scott et al., 2003).

Dans les sous-chapitres suivant nous discuterons des différentes méthodes d'inactivation du motif RXR utilisées par diverses protéines possédant le motif RXR et

recenserons l'ensemble des observations faites pour le masquage du motif di-arginine de l'isoforme p35 de la chaîne invariante.

5.3.1 Le masquage stérique

Le masquage stérique du motif RXR est la façon la plus simple d'inactiver le motif de rétention au RE. Ici, le masquage stérique des motifs de rétention résulte de l'association de sous-unités en complexe hétéro-oligomérique, sans quoi les sous-unités non-assemblées demeurent dans le RE (Nufer et Hauri, 2003). La dimérisation des sous-unités GB1 et GB2 du récepteur GABA_B illustre parfaitement ce mécanisme de libération du RE (Margeta-Mitrovic et al., 2000). La sous-unité GB1 du récepteur possède un motif RXR fonctionnel à l'extrémité C-terminale de sa queue cytoplasmique à proximité d'une superhélice α (Margeta-Mitrovic et al., 2000). L'association de cette superhélice α à celle de la sous-unité GB2 assure non seulement la dimérisation du récepteur mais aussi le masquage du motif RXR permettant la libération du RE du récepteur GABA_B (Margeta-Mitrovic et al., 2000; Brock et al., 2005). Un second exemple illustrant ce mécanisme est celui du canal sodique Na_v1.8 (Zhang et al., 2008). La sous-unité α du canal, aussi nommée Na_v1.8, possède un motif RXR fonctionnel localisé dans sa première boucle intracellulaire (Zhang et al., 2008). Lors de la juxtaposition de la sous-unité Na_v1.8 à une sous-unité β , le domaine C-terminal de la sous-unité β masque le motif de rétention au RE par et permet le transport antérograde du récepteur (Zhang et al., 2008). Bien que le masquage stérique semble une

façon simple et efficace de permettre le transport antérograde, les exemples illustrant ce phénomène sont peu nombreux.

5.3.2 Le masquage par phosphorylation

Le masquage du motif RXR par la phosphorylation a été identifié pour les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA). Ceux-ci sont formés d'au moins une sous-unité NR1 et d'au moins une sous-unité NR2 (Standley et al., 2000). De manière générale, l'expression en surface du récepteur dépend de l'assemblage du complexe NR1/NR2; il existe pourtant des isoformes de la sous-unité NR1 exprimées en surface en absence de la sous-unité NR2. Comme pour l'isoforme p35 de la chaîne invariante qui doit son motif RXR à l'utilisation d'un codon d'initiation alternatif, la nature des modifications de l'ARNm de la sous-unité NR1 détermine la présence de ce motif dans les différentes isoformes. Ainsi, l'épissage alternatif de l'ARNm correspondant au domaine C-terminal de la sous-unité NR1 dicte l'expression en surface ou la localisation intracellulaire de celle-ci (Scott et al., 2001). L'épissage alternatif résultant en l'expression des cassettes C0-C1-C2 engendre une sous-unité NR1-1 localisée au RE par la présence d'un motif di-arginine (R893-R894-R895) au sein de la cassette C1. Ce motif di-arginine est entouré de trois sérines : S890, S896 et S897. Les sérines S890 et S896 sont phosphorylées par la protéine kinase C (PKC) alors que la sérine S897 est phosphorylée par la protéine kinase A (PKA) (Tingley et al., 1993; Ehlers et al., 1995; Tingley et al., 1997; Scott et al., 2001). Des études sur la phosphorylation de ces sérines ont permis de mettre en évidence leur rôle dans le masquage du motif de rétention. Dans un

premier temps, Scott *et al*, ont démontré que l'activation de PKC par le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) dans des cellules COS7 transfectées avec le NR1-1 résulte en l'apparition de cette sous-unité à la membrane plasmique (Scott et al., 2001). La mutation des sérines S896 et S897 par un acide aminé chargé négativement (SS896-7EE) qui mime la forme phosphorylée cause aussi la relocalisation de la sous-unité NR1 à surface cellulaire (Scott et al., 2001). En revanche, la mutation de ces mêmes sérines pour des alanines retient la sous-unité au RE (Scott et al., 2001). Dans des travaux subséquents, les auteurs observent que la phosphorylation par PKC des sérines S890 et S896 est nécessaire à la sortie du mutant S897E de la sous-unité NR1-1 (Scott et al., 2003). Ces résultats supportent un modèle où la coordination de l'activité PKC et PKA est nécessaire à la sortie du RE de la protéine, et dans un deuxième temps, suggèrent que la phosphorylation des sérines adjacentes au motif di-arginine permet la localisation en surface de la sous-unité du récepteur NMDA (Scott et al., 2003).

En 1998, deux groupes observent la phosphorylation de l'isoforme p35 (Anderson et Roche, 1998; Kuwana et al., 1998). Deux sérines, S6 et S8 sont présentes à proximité du motif RXR de l'isoforme p35 de la chaîne invariante (figure 11). Ces deux groupes ont utilisé la mutagenèse pour démontrer que ces deux sérines sont phosphorylées sur p35 (Anderson et Roche, 1998; Kuwana et al., 1998). Kuwana *et al*, démontrent dans des cellules HeLa que la mutation de la sérine 8 pour une alanine (p35_{S8A}) a pour effet de réduire vigoureusement le marquage de phosphorylation de la chaîne invariante alors que la mutation de la sérine 6 (p35_{S6A}) réduit de manière plus modeste le marquage (Kuwana et al., 1998). Ces résultats

suggèrent que la sérine 8 est le résidu majoritairement phosphorylé de p35 (Kuwana et al., 1998).

Afin de démontrer le rôle de la phosphorylation de p35 dans le transport antérograde, Kuwana *et al*, utilisent le mutant dynamine K44A leur permettant de retenir et d'observer les complexes li-CMHII en surface (Kuwana et al., 1998). Lorsqu'exprimés en présence de DR, la forme sauvage de la chaîne invariante la chaîne invariante et le mutant p35_{S6A} s'accumulent à la surface cellulaire alors que les mutants de la sérine 8, p35_{S8A} et p35_{S6,8A}, ne sont pas présents en quantités significatives (Kuwana et al., 1998). Ces résultats de Kuwana *et al*, suggèrent que la phosphorylation de la sérine 8 de l'isoforme p35 est essentielle à la sortie du RE des complexes (Kuwana et al., 1998). On notera que le mutant p35_{S8D} dont la sérine 8 est remplacée par un acide aminé chargé négativement (D) qui mime le statut de phosphorylation, lorsqu'exprimé avec DR et le mutant dynamine, s'accumule à la surface cellulaire à la manière de la chaîne invariante sauvage (Kuwana et al., 1998).

Parallèlement, Anderson *et al*, utilisent un inhibiteur de sérine/thréonine kinases, la staurosporine, pour établir l'importance de la phosphorylation dans le transport antérograde de p35 dans les CPAs (Anderson et Roche, 1998). Leurs résultats montrent que l'inhibition de la phosphorylation dans ces cellules résulte en une diminution du produit du clivage de la chaîne invariante, suggérant un rôle des kinases dans le transport vers les endosomes de l'isoforme p35 de la chaîne (Anderson et Roche, 1998). En 1999, le même groupe de chercheurs démontre, suite à l'activation par la PMA, que la PKC est responsable de cette phosphorylation et que la phosphorylation par PKC de la chaîne invariante accélère

la cinétique de dégradation des complexes li-CMHII et du chargement peptidique des CMHII (Anderson et al., 1999).

Afin de confirmer leurs résultats les deux groupes ont analysé le statut de sialylation des mutants en présence de DR afin de mettre en évidence la sortie ou la retenue au RE de ces mutants. Chez Kuwana *et al*, le marquage métabolique démontre une modification des sucres associée à un passage par l'appareil de Golgi pour le p35 sauvage et p35_{S8D}, alors qu'aucune modification n'est observée pour le mutant p35_{S8A}. Contrairement aux résultats obtenus par Kuwana *et al*, Anderson *et al*, ont observé l'acquisition d'acide sialique sur le mutant p35_{S8A} et suggèrent que la phosphorylation de p35 est associée non pas à sa sortie du RE mais à la sortie de l'appareil de Golgi (Anderson et al., 1999). Ainsi, le rôle exact de la phosphorylation de l'isoforme p35 de la chaîne invariante dans son ciblage ou dans l'exécution de ses autres fonctions demeure toujours incertain. Un des rôles proposés pour cette phosphorylation serait une fonction indirecte dans la sortie des complexes li-CMHII du RE par sa contribution à la liaison d'une protéine accessoire 14-3-3 que nous aborderons dans la section suivante (figure 13).

5.3.3 Interférence par la liaison de 14-3-3 ou du domaine PDZ

5.3.3.1 Interférence par la liaison de 14-3-3

Les protéines 14-3-3 sont de petites protéines eucaryotiques dont la séquence est hautement conservée (Bartel et al., 2014). Elles représentent une famille de protéines dimériques cytoplasmiques solubles, dont sept isoformes (β , γ , ε , η , σ , τ et ζ) ont jusqu'à

maintenant été identifiées (van Heusden, 2005; Bartel et al., 2014). L'interactome de ces 7 différentes isoformes de 14-3-3 compte plus de 200 protéines, la plupart desquelles sont phosphorylées (van Heusden, 2005; Shikano et al., 2006; Bartel et al., 2014). Le rôle principal des protéines 14-3-3 est d'assurer le trafic intracellulaire des protéines associées ainsi que la régulation de multiples processus cellulaires (Shikano et al., 2006; Bartel et al., 2014). Les motifs consensus connus pour la liaison de 14-3-3 sont composés de phosphosérines bordées d'arginines et de prolines (-RSXS^PXP- et -RXXS^PXP-) (van Heusden, 2005).

Dans un effort de décrire un mécanisme consensus pour le transport antérograde de complexes protéiques ayant un motif di-arginine, O'Kelly *et al*, ont concentré leurs efforts sur les mêmes 4 protéines identifiées précédemment dans la section 5.2 soit : KCNK3 et KCNK9, la sous-unité $\alpha 4$ de nAChR et l'isoforme p35 de la chaîne invariante (O'Kelly et al., 2002). Nous décrirons dans les paragraphes suivants leurs observations sur l'implication de 14-3-3 dans le transport antérograde de ces différentes protéines.

Le canal potassique KCNK3 est un complexe homodimérique; son recyclage au RE est contrôlé par la liaison de β COP au motif RXR dans la région N-terminale de la protéine (O'Kelly et al., 2002; Shikano et al., 2005). Par un système double-hybride chez la levure, O'Kelly *et al*, ont mis en évidence la liaison de 14-3-3 β à un peptide correspondant au domaine C-terminal de KCNK3 (RRSSV) (O'Kelly et al., 2002). Des essais d'interactions peptidiques ont dévoilé la liaison de l'isoforme 14-3-3 β , isolée à partir de cerveau de rat, à la forme phosphorylée de ce peptide (O'Kelly et al., 2002). L'immunoprécipitation de KCNK3

suivit de l'immunoprécipitation de 14-3-3 ou β COP distinguent la présence de deux populations de récepteurs : la première liée à β COP et la seconde à 14-3-3 (O'Kelly et al., 2002). De ce fait, ces résultats suggèrent une liaison mutuellement exclusive de 14-3-3 et β COP à KCNK3 (O'Kelly et al., 2002). De la même façon, O'Kelly *et al*, ont identifié un peptide correspondant à l'extrémité N-terminale de KCNK9 liant β COP et un peptide phosphorylé correspondant au domaine C-terminal de la protéine liant 14-3-3 (O'Kelly et al., 2002). Un mécanisme homologue est aussi observé pour la sous-unité $\alpha 4$ du récepteur nAChR, où β COP lie un peptide correspondant au motif RXR situé en position aa 347-348 de la protéine alors que 14-3-3 lie un peptide phosphorylé correspondant à la séquence de liaison consensus en position aa 438-443 (O'Kelly et al., 2002). Alors que β COP et 14-3-3 lient des régions distinctes chez KCNK3, KCNK9 et $\alpha 4$, les auteurs démontrent que les séquences liées par ces deux protéines se chevauchent dans la queue cytoplasmique de p35 (figure 11). Comme pour les exemples précédents, les liaisons de 14-3-3 et de β COP à p35 sont mutuellement exclusives (O'Kelly et al., 2002). Selon leurs observations, la liaison de 14-3-3 corrèle avec la perte d'interaction avec β COP et l'expression en surface de la protéine. Les auteurs concluent donc que l'expression en surface des complexes protéiques résultent de la liaison, dépendante de la phosphorylation, de 14-3-3 β (O'Kelly et al., 2002). La liaison de 14-3-3 permet le relâchement de β COP qui est responsable de la rétention au RE (O'Kelly et al., 2002). Ainsi, l'expression en surface de protéines suite à la liaison de 14-3-3 représente un mécanisme inductible physiologiquement par l'activation de kinases.

Le modèle prévalant actuellement dans la littérature pour le masquage du motif

RXR et la sortie du RE de l'isoforme p35 (et qui vaut aussi pour les autres protéines à motifs RXR liant 14-3-3 et β COP) est le suivant : l'interaction de β COP au motif RXR permet de retenir l'isoforme p35 au RE par un transport rétrograde dépendant des vésicules COPI. Suite à la phosphorylation de la sérine 8 de l'isoforme p35, celle-ci est alors en mesure de lier 14-3-3, ce qui empêche la liaison de β COP (figure 13). S'en suit le transport antérograde de la chaîne invariante vers la surface cellulaire. Le rôle du classe II sera discuté plus tard.

5.3.3.2 Interférence par la liaison du domaine PDZ, le cas de NMDA

Le récepteur NMDA existe en surface cellulaire sous la forme d'un complexe NR1/NR2; de manière générale, la sous-unité NR2 facilite l'expression en surface de la sous-unité NR1 (Standley et al., 2000). Toutefois, l'isoforme NR1-1 formée des cassettes C0-C1-C2, qui renferme un motif RXR, dépend de sa phosphorylation pour accéder à la surface cellulaire (voir section 5.3.2). Il existe une seconde isoforme de NR1, le NR1-3, composée des cassettes C0-C1-C2', qui bien que possédant le motif RXR présent dans la cassette C1 accède aussi à la surface cellulaire en absence de phosphorylation (Standley et al., 2000; Scott et al., 2001). L'isoforme NR1-3 diffère de NR1-1 par la présence de la cassette C2'. On retrouve à l'extrémité C-terminale de la cassette C2' un domaine d'interaction PDZ (Standley et al., 2000; Scott et al., 2001). La mutation de ce domaine de liaison à une protéine PDZ endogène a pour effet de retenir au RE la sous-unité NR1-3 (Standley et al., 2000; Scott et al., 2001). Ainsi, tout comme 14-3-3, les protéines PDZ pourraient permettre

le transport antérograde des protéines possédant un motif RXR et un domaine de la liaison PDZ (Standley et al., 2000; Scott et al., 2001).

5.3.4 p35, le masquage par la queue des chaînes β des CMHII

Bien que O'Kelly *et al.*, suggère que la phosphorylation de l'isoforme p35 et sa liaison à 14-3-3 sont les deux étapes qui assure la sortie du RE de l'isoforme p35, le rôle du CMHII est critique. En effet, le groupe de Cresswell ont démontré que les trimères de la chaîne invariante sont retenus au RE en absence des CMHII mettant en relief un rôle pour ces molécules dans le transport antérograde des trimères de la chaîne invariante (Marks et al., 1990).

Des travaux effectués dans notre laboratoire ont permis de démontrer l'importance de la chaîne β des molécules de CMHII dans le transport antérograde de complexes p35-CMHII (Khalil et al., 2003; Khalil et al., 2005). En présence d'un mutant de la chaîne DR β dont la queue cytoplasmique est supprimée, on obtient une rétention au RE des CMHII par l'isoforme p35 de la chaîne invariante (Khalil et al., 2003). On n'observe dans ces conditions aucune sialylation des CMHII, une abolition de leur expression en surface et une suppression de la production de CLIP (Khalil et al., 2003). À noter que l'absence de queue cytoplasmique de la chaîne α n'a pas d'impact sur le transport antérograde de l'isoforme p35. Du fait que les autres isotypes des CMHII ont aussi la capacité de promouvoir le transport antérograde de p35 et que leurs domaines cytoplasmiques possèdent une très faible homologie avec ceux de DR, la présence d'un motif de masquage de la séquence RXR

de p35 au sein de la queue de DR β est très peu probable (Khalil et al., 2003). Cette absence de motif dans le domaine cytoplasmique de DR β suggère la présence d'un masquage stérique du motif RXR (Khalil et al., 2003). Toutefois, des travaux subséquents dans notre laboratoire ont permis d'identifier que 3 acides aminés seulement, dont la nature semble peu importante, suffisent à assurer un transport antérograde (Khalil et al., 2005). De façon similaire, des travaux effectués sur le récepteur NMDA ont montré que la sortie de la sous-unité NR1 (en absence de phosphorylation) dépend de la présence d'une queue cytoplasmique de 3 aa de la sous-unité NR2 (Yang et al., 2007).

Il est difficile de concilier ces résultats avec l'hypothèse d'un masquage stérique du motif RXR de p35 par la queue cytoplasmique de DR β pour 3 raisons distinctes;

- 1- le motif RXR de p35 se situe à 41 aa de la membrane ce qui l'en éloigne suffisamment pour être difficilement masqué par une queue cytoplasmique longue de 3 aa;
- 2- il est difficile de concevoir que 3aa de DR β serait responsable du masquage stérique du motif RXR alors que la queue de DR α de 15 aa avec des chaînes latérales complexes n'est pas en mesure d'assumer une telle fonction;
- 3- un DR β sauvage n'est pas capable d'assurer la sortie du RE d'un mutant non phosphorylé de p35 (Khalil et al., 2005).

La capacité de la queue cytoplasmique de la chaîne DR β des CMHII à promouvoir le transport antérograde de p35 ne semble pas relever de la présence d'un motif de masquage ni d'un masquage stérique par celle-ci; ainsi, la nature du masquage par la chaîne β reste à ce jour obscure. Dans le contexte du modèle suggéré par Koch *et al*, en 2011 où la formation de complexes pentamériques $\alpha\beta I_i 3$ prévaut sur la formation de complexes nonamériques $(\alpha\beta I_i)3$, on peut s'interroger sur la capacité d'une seule chaîne β à masquer les 3 motifs RXR présents dans un pentamère $\alpha\beta p35_3$.

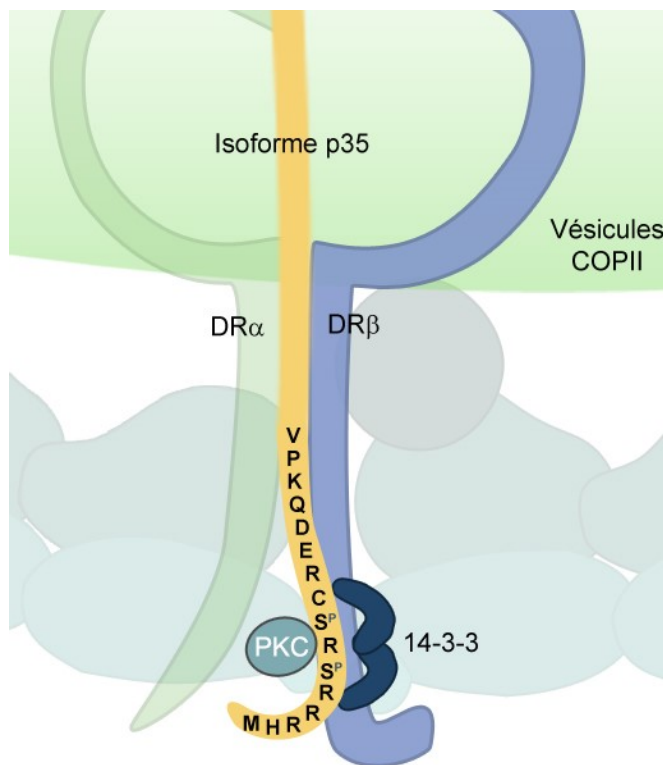


Figure 13: Transport antérograde de l'isoforme p35. Les sérines 6 et 8 de la queue cytoplasmique de p35 (orange) sont phosphorylées par PKC (bleu pâle). 14-3-3 (bleu foncé) lie la queue cytoplasmique phosphorylée de p35. Cette liaison empêche la liaison de β COP associé au transport rétrograde. Enfin, la queue cytoplasmique de DR β masque le motif RXR permettant le transport antérograde de l'isoforme p35.

5.4 Étude de la stœchiométrie des complexes li-CMHII

Les fondements physiologiques sous-jacents à la formation de trimères de la chaîne invariante ainsi qu'à la formation de complexes li-CMHII à stœchiométrie variable restent à élucider. Il a été proposé que la trimérisation de la chaîne invariante module la force du signal de ciblage aux endosomes. De plus, l'incorporation d'une chaîne de l'isoforme p35 à l'intérieur d'un trimère permettra de déterminer la localisation de la chaîne invariante (Arneson et Miller, 1995). Outre les considérations de ciblage intracellulaires, la trimérisation de la chaîne invariante pourrait lui permettre d'agir à titre de récepteur de MIF à la surface cellulaire. Comme MIF existe sous forme de trimères, il est fort probable que la trimérisation de la chaîne invariante soit requise afin de permettre la liaison de cette cytokine (Sun et al., 1996; Reidy et al., 2013). D'autre part, la trimérisation du récepteur la chaîne invariante à la membrane pourrait permettre d'assurer une activation efficace des voies de signalisation suite à la liaison de MIF ou *H. pylori*.

D'autre part, la raison pour la formation de complexe li-CMHII à stœchiométries variables est mal comprise. Bien que la formation de pentamères, d'heptamères et de nonamères a été proposée, aucune fonction ne leur a été attribuée. On peut imaginer qu'une stœchiométrie moins complexe, tel qu'un pentamère, puisse être associée à un transport rapide entre le RE et les endosomes. En revanche, la formation de nonamères suggère un ralentissement de ce transport ainsi que la possibilité de l'incorporation de différents isotypes au sein d'un même complexe.

Ainsi, on peut s'interroger s'il existe un avantage à ralentir ou à accélérer le trafic des complexes li-CMHII en réponse à certains pathogènes. De même, on peut se demander s'il existe un avantage à l'incorporation de différents isotypes de CMHII autour d'une même trimère de la chaîne invariante. À tout le moins, la possibilité d'une régulation précise de la stœchiométrie et de la vitesse du transport des complexes li-CMHII pourrait vraisemblablement représenter un avantage dans l'efficacité de la présentation antigénique de classe II à différents pathogènes.

Dans ce contexte, nous émettons l'hypothèse voulant que l'isoforme p35 de la chaîne invariante module l'assemblage et la stœchiométrie des complexes li-CMHII.

Les objectifs suivants seront poursuivis:

- 1- Déterminer si les complexes li-CMHII s'assemblent dans des stœchiométries variables, soient des pentamères, des heptamères et des nonamères.
2. Établir le rôle de l'isoforme p35 et de son motif de rétention dans l'assemblage des complexes li-CMHII et leur transport.
3. Évaluer au niveau structurel le rôle relatif des domaines impliqués dans la trimérisation de la chaîne invariante.

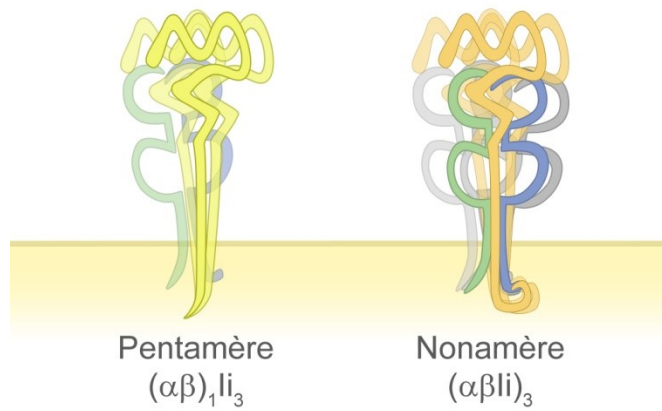
Comme la grande majorité des conclusions portant sur la trimérisation de la chaîne et la stœchiométrie des complexes li-CMHII repose sur des évidences biochimiques, nous avons préféré une approche fonctionnelle novatrice basée sur la mesure de l'expression en

surface des complexes li-CMHII dans des lignées cellulaires transfectées et coexprimant les molécules d'intérêts dans leur forme native ou mutée.

Ces études permettront de mieux comprendre le ciblage de la chaîne invariante et des molécules de classe II. De plus, nos travaux apporteront un éclairage nouveau sur le rôle de l'isoforme p35 chez l'humain dans la régulation du transport des molécules HLA.

CHAPITRE 2 : RÉSULTATS

1 Article 1: L'isoforme p35 de la chaîne invariante favorise la formation de complexes nonamériques avec les molécules de CMHII.



SHORT COMMUNICATION

The invariant chain p35 isoform promotes formation of nonameric complexes with MHC II molecules

Maryse Cloutier, Catherine Gauthier¹, Jean-Simon Fortin¹ and Jacques Thibodeau

Four different isoforms of the human invariant chain (Ii) have been described (p33, p35, p41 and p43). These heterotrimerize in the endoplasmic reticulum (ER) before associating with MHC class II molecules (MHCII). However, the final stoichiometry of the Ii/MHCII complex remains debated. This is particularly interesting as both p35 and p43 include a di-arginine motif that requires masking by MHCII to allow ER egress. Here, to functionally address the requirement for stoichiometric interactions, we used a recombinant DR heterodimer bearing its own cytoplasmic di-lysine ER-retention motif (DR_{KKAA}). When coexpressed with p33 and a control myc-tagged DR (DR_{myc}), DR_{KKAA} was retained in the ER but had little impact on surface expression of DR_{myc}. However, when coexpressed with p35, DR_{KKAA} restricted the surface expression of DR_{myc}, indicating that Ii trimers can be loaded with more than one MHCII. Similar results were obtained using HLA-DQ instead of DR_{myc}, showing that a single trimeric Ii scaffold can include distinct MHCII isotypes. Altogether, these results demonstrate that the subunit stoichiometry of oligomeric Ii/MHCII complexes is influenced by p35.

Immunology and Cell Biology advance online publication, 18 March 2014; doi:10.1038/icb.2014.17

INTRODUCTION

In the endoplasmic reticulum (ER), the invariant chain (Ii; CD74) functions as a scaffold protein for MHC class II molecules (MHCII).¹ As a result of alternative splicing and different start codon usage, humans express four Ii isoforms (p33, p35, p41 and p43), of which p33 and p35 are the most predominantly expressed.^{2–4} Both p35 and p43 bear a 16-amino acid cytoplasmic extension including a strong di-arginine (RxR) ER-retention motif.^{5,6} Our earlier work has shown that the ‘masking’ of the RxR motif is strictly dependent on MHCII binding and requires the β chain cytoplasmic domain.⁷

All Ii isoforms contain cytoplasmic leucine-based endosomal sorting signals as well as a luminal class II-associated invariant chain peptide (CLIP) and a C-terminal trimerization domain.^{8,9} According to the current model proposed by Roche *et al.*,³ three MHCII $\alpha\beta$ heterodimers associate with a preformed Ii trimer, creating a stoichiometric structure ($\alpha_3\beta_3\text{Ii}_3$) that exits the ER. Once in endosomes, Ii is degraded, leading to disruption of the nonamer and the generation of CLIP in the peptide-binding groove of MHCII.¹⁰ HLA-DM catalyzes the exchange of CLIP for high-affinity peptides.¹¹

A recent report showed that soluble human Ii and MHCII coproduced in cell lines are secreted around a trimeric Ii scaffold as either pentamers, heptamers or nonamers.¹² However, Koch *et al.*,¹³ challenged the existence of high-order structures and postulated that due to structural constraints imposed by the anchoring membrane, Ii and MHCII can only form pentamers ($\alpha_1\beta_1\text{Ii}_3$). Given the divergent

results obtained so far using traditional biochemistry techniques,^{3,13} we chose to shed new light on the assembly and stoichiometry of the complex using a functional approach. Our data revealed that although nonamer formation is not a prerequisite for ER egress, the presence of p35 favors the inclusion of more than one MHCII per Ii trimer.

RESULTS AND DISCUSSION

p35 affects the stoichiometry of the MHCII/Ii complex

To determine functionally if more than one MHCII incorporate a given Ii trimer, we needed a cellular system expressing two distinct MHCII, one of which was unable to egress from the ER. This was achieved by designing a MHCII β chain bearing its own di-lysine (β_{KKAA}) ER-retention motif (Figure 1a). The C-terminal cytoplasmic di-lysine sequence acts as a strong retention signal for ER-resident type I proteins and recombinant reporter molecules displaying this motif localize in the ER.¹⁴ Also, we engineered a distinct control MHCII β chain bearing a myc tag (DR_{myc}) instead of the di-lysine signal (Figure 1a). We reasoned that if an Ii trimer was to bind more than one MHCII, the ER-retained variant of DR (DR_{KKAA}) would indirectly prevent cell surface expression of coexpressed DR_{myc} that stochastically integrated the complex. In contrast, if only pentamers can form (DR α_1 DR $\beta_{\text{KKAA}}\text{Ii}_3$ or DR α_1 DR $\beta_{\text{myc}}\text{Ii}_3$), the fate of DR_{KKAA} and DR_{myc} molecules should be independent.

We first confirmed that DR_{KKAA} could not reach the plasma membrane. HEK293T cells were transiently transfected with DR_{KKAA}

Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

¹These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Dr J Thibodeau, Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, C.P. 6128 succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

E-mail: jacques.thibodeau@umontreal.ca

Received 6 June 2013; revised 15 January 2014; accepted 5 February 2014

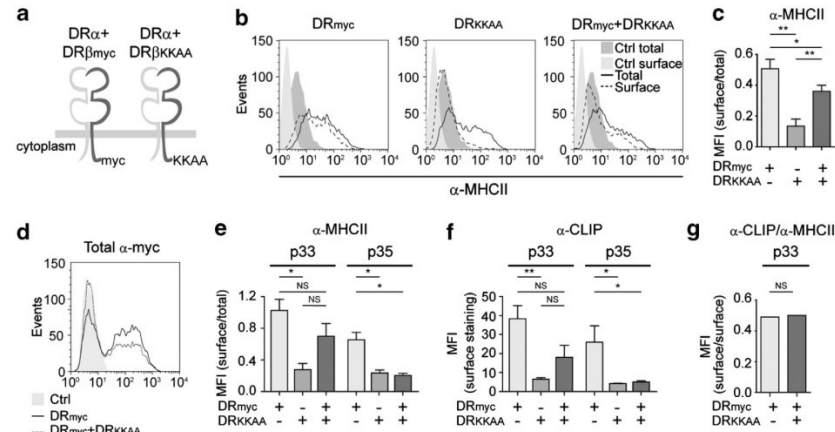


Figure 1 p35 favors the formation of high-order oligomers with MHCII (a) Schematic representation of DR_{myc} and DR_{KKAA}. (b) HEK293T cells were transfected with DR α and either DR β _{myc} (DR_{myc}), DR β _{KKAA} (DR_{KKAA}) or both DR_{myc} and DR_{KKAA}. Cells were stained for the cell surface expression of MHCII using L243. Alternatively, cells were permeabilized with saponin and stained. The controls (ctrl) represent mock-transfected cells stained in the same conditions. (c) The mean fluorescence intensities (MFIs) obtained in b were plotted. (d) DR_{myc} and DR_{myc}+DR_{KKAA}-expressing cells were permeabilized and stained with a myc tag-specific monoclonal antibody. (e) HEK293T cells were transfected with DR_{myc} and/or DR_{KKAA} together with p33 or p35. Cells were analyzed by flow cytometry using L243 to evaluate the efficiency of transport of MHCII. (f) Cells from e were stained for cell surface expression of CLIP. (g) The CLIP/MHCII expression ratios were calculated for a representative experiment. Paired Student's *t*-tests were performed; **P*≤0.05, ***P*≤0.01; NS, non-significant *P*≤0.1. Error bars indicate the s.d. from at least three independent experiments.

or DR_{myc} and analyzed by flow cytometry (Figure 1b). In line with the presence of a functional ER-retention motif, DR_{KKAA} was almost absent from the cell surface but could be detected upon membrane permeabilization. Confocal microscopy confirmed the ER retention of DR_{KKAA} (Supplementary Figure 1). Then, we assessed the fate of DR_{myc} when coexpressed with DR_{KKAA}. As expected, DR_{myc} was expressed at the plasma membrane independent of the presence of the ER-retained DR_{KKAA} (Figure 1b, right panel). To quantify these findings and to account for variations in the transfection efficiencies, the mean fluorescence intensities were plotted as ratios between surface and total staining (Figure 1c). Such ratios are lower for ER-retained molecules versus those that efficiently traffic to the cell surface.¹⁵ That the relative proportion of MHCII at the surface was somewhat intermediate when the two types of DR were coexpressed is probably due to the fact that DR_{KKAA} contributed to increase only the 'total' pool of molecules. Also, expression of the DR_{myc} is usually slightly less efficient in cotransfection experiments (Figure 1d).

We then assessed the impact of DR β _{KKAA} on the surface expression of β _{myc} in the presence of Iip33. First, when the control DR_{myc} was the sole source of β chains, MHCII were found at the surface (Figure 1e). Importantly, CLIP was detected as well, indicating that MHCII trafficked in association with Ii (Figure 1f). As expected, MHCII and CLIP were almost absent from the surface when DR_{KKAA} was transfected with p33. Interestingly, when both β chains were coexpressed together with p33, MHCII were detected at the plasma membrane (Figure 1e). Confocal microscopy confirmed the ER egress of DR_{myc} (Supplementary Figure 2A). Because it is unlikely that nonamers formed simultaneously and exclusively of either DR_{myc} or DR_{KKAA} without the inclusion of at least one competing DR counterpart, the detection of MHCII and CLIP at the surface strongly suggests that some DR_{myc}-associated but unsaturated Ii trimers (most likely pentamers) egressed from the ER before DR_{KKAA} could integrate the complex (Figures 1e and f). The DR over CLIP surface mean fluorescence intensity ratios were identical for DR_{myc} in

the presence or absence of DR_{KKAA}, confirming that the MHCII trafficked with Ii (Figure 1g).

Finally, we repeated these experiments with p35. We postulated that p35 homotrimers would incorporate MHCII until a nonamer is formed and all RxR motifs are masked. Indeed, p35 must form a stoichiometric complex with MHCII to egress the ER, precluding egress of pentamers or heptamers.⁷ Thus, stochastic incorporation of DR_{KKAA} in unsaturated DR_{myc}/Ii complexes (or vice-versa) should result in the downmodulation of DR_{myc} surface expression. We expressed DR_{KKAA} and/or DR_{myc} alongside p35 homotrimers. When p35 was expressed with DR_{myc}, MHCII and CLIP were found at the plasma membrane (Figures 1e and f). Remarkably, when DR_{myc} and DR_{KKAA} were coexpressed in the presence of p35, neither MHCII nor CLIP was found at the cell surface (Figures 1e and f). Confocal microscopy revealed that the MHCII remained in the ER (Supplementary Figure 2). On the basis of these findings, we conclude that p35 trimers were retained in the ER until saturated with MHCII. However, as β chains are incorporated randomly, it is likely that most nonamers contained at least one β _{KKAA} chain, thereby causing retention of associated DR_{myc}.

Iip35 generates nonamers composed of mixed MHCII isotypes

The ability of p35 to generate high-order structures implies that different MHCII isotypes can be part of a given heptamer or nonamer. To test this possibility, we evaluated the capacity of the DR_{KKAA} mutant to retain DQ in the ER. Cells were transfected with either DQ alone, DQ and DR or DQ and DR_{KKAA} in the presence of either p33 or p35. First, when coexpressed with p33 or p35, DQ was detected at the plasma membrane along with CLIP (Figures 2a and b). This result is in line with our previous report showing that DQ efficiently masks the RxR motif of Iip35.⁷ Interestingly, in the presence of p33, DQ surface expression was not affected by DR_{KKAA} (Figure 2a). As for DR_{myc}, this suggests that non-saturated DQ/p33 complexes can egress the ER, independently of DR_{KKAA}. However,

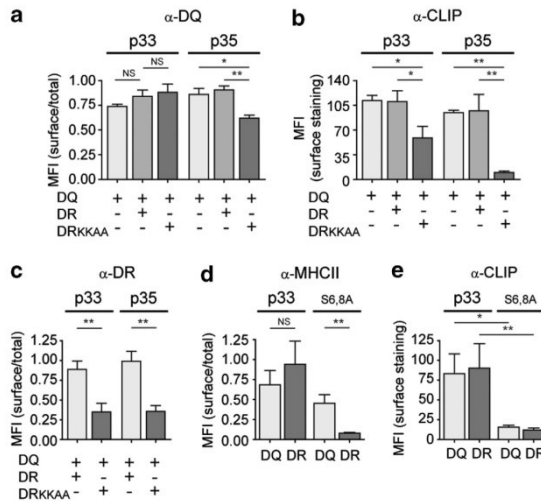


Figure 2 Different MHCII isotypes can bind the same Ii trimer. (a–c) HEK293T cells were transiently transfected with DQ, DQ and DR or DQ and DR_{KKAA} alongside p33 or p35. (a) After 48 h, cells were analyzed by flow cytometry to derive DQ surface over total expression ratios using anti-DQ specific antibody. (b) Surface CLIP expression was assessed by flow cytometry and the mean fluorescence intensities (MFIs) were plotted. (c) Cells transiently transfected with DQ and DR, or DQ and DR_{KKAA}, alongside p33 or p35 were stained for DR. (d, e) HEK293T cells were transiently transfected with DQ or DR together with p33, or p35_{S6,8A}. After 48 h, cells were analyzed by flow cytometry to evaluate DQ and DR surface to total expression ratio using anti-DQ and L243 antibodies, respectively (d) or CLIP surface expression (e). MFIs were plotted and paired Student's *t*-tests were performed; **P* ≤ 0.05, ***P* ≤ 0.01; NS, non-significant *P* ≤ 0.1. Error bars indicate the s.d. from at least three independent experiments.

the need for stoichiometric MHCII/p35 interactions resulted in the formation of doomed complexes including both DQ and DR_{KKAA}. The DR_{KKAA}-mediated ER retention of DQ was specific as it was not observed with WT DR. Noteworthy, the trafficking toward the cell surface of DQ was not totally abolished by p35 and DR_{KKAA}. Given that no CLIP was detected at the cell surface (Figure 2b), we hypothesized that these cell surface DQ molecules did not interact with Ii and trafficked on their own. To test this possibility, we compared the capacity of DR and DQ with escape ER retention by p35_{S6,8A}, an unphosphorylatable Ii variant that never leaves the ER.^{16,17} Figures 2c and d show that although both DQ and DR are well expressed at the plasma membrane and yield CLIP with lip33, only DQ was detected at the cell surface with p35_{S6,8A}. As there was no trace of CLIP, we conclude that some DQ molecules egressed the ER without Ii. Altogether, these results demonstrate the existence of mixed heptamers or nonamers containing different MHCII isotypes.

Model for the assembly of Ii/MHCII complexes

In the ER, nascent Ii chains homo- or heterotrimerize before interacting with MHCII (Supplementary Figure 3). As Ii is often in vast excess and half of the Ii pool exists as p33 homotrimers, some MHCII-free or unsaturated lip33 trimers (pentamers and/or heptamers) may exit the ER.^{16,18,19} However, the p33/p35 ratio will also have a key impact on the stoichiometry of the complex. Indeed, the presence of p35 in any Ii heterotrimer will force the sequential addition of MHCII units until each and every RxR motif is masked. Thus, depending on which Ii subunit binds the MHCII first and

assuming that all p35 molecules are rapidly phosphorylated, an Ii heterotrimer containing one p35 should have a 33% chance of being released from the ER as a pentamer. As the sequential binding of MHCII on the Ii trimer was shown to be non-cooperative,²⁰ Ii trimers will compete with newly formed pentamers for the available MHCII. Although Ii is required for DP to reach the endocytic pathway,²¹ it remains to be determined if mixed complexes include any of the three MHCII allotypes.

In conclusion, our findings do not support the hypothesis that pentameric MHCII–Ii complexes are bent towards the cell membrane, thereby inhibiting the binding of additional MHCII.¹³ As the expression of p33 and p35 is differentially regulated in diseases such as chronic lymphocytic leukemia and type 1 diabetes, stoichiometric MHCII/Ii variations may prove to be clinically relevant.^{22,23}

METHODS

Plasmids and mutagenesis

The pBud DRαβ and pLNCX DQ plasmids have been described previously.^{7,24} The DRβ chain was subcloned into pcDNA3.1/myc (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) to generate DRβ_{myc}. DRα and p35_{LIML}, p33_{LIML}, pBud p35_{LIML}_{S6,8A} and DRβ_{KKAA} were subcloned into pcDNA3.1 from previously described constructs or were generated by PCR using mutagenic primers.^{7,15} All Ii molecules used in this study had mutations disrupting their cytoplasmic leucine-based endosomal sorting signals (p33_{LIML}, p35_{LIML} and p35_{LIML}_{S6,8A}). This maximizes the surface expression of Ii upon ER egress, allowing us to easily ascertain transfection efficiency.¹⁵

Antibodies

The following mouse monoclonal antibodies were described previously:^{7,24} L243 (HLA-DR); CerCLIP.1 (CLIP); HLA-DQ FITC (Life Science, Memphis, TN, USA) and 9e10 (myc-tag; Biolegend, San Diego, CA, USA). Secondary Alexa-fluor-coupled antibodies (Invitrogen) were used for flow cytometry.

Transfections and flow cytometry

HEK 293 T cells (3.5 million; ATCC CRL-11268) were plated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 5% fetal bovine serum (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) in a six-well plate. After 8 h, cells were transiently transfected in triplicates using 3 μg polyethylenimine (Polysciences, Warrington, PA, USA) per μg of DNA. Two μg of each DNA were transfected for each condition and, when necessary, empty plasmids were used to adjust the final DNA concentrations. After 48 h at 37 °C, cells were harvested and washed in phosphate-buffered saline. To determine surface expression, live cells were stained on ice and analyzed by flow cytometry on a FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). For total expression, cells were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized with saponin 0.05% and stained, as described previously.²⁴

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank P Cresswell and L Denzin for the Cer.CLIP.1 antibody and RP Sékaly for the Ii cDNA and the L243 hybridoma. This research was funded by a grant from the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) to JT (grant number 298537).

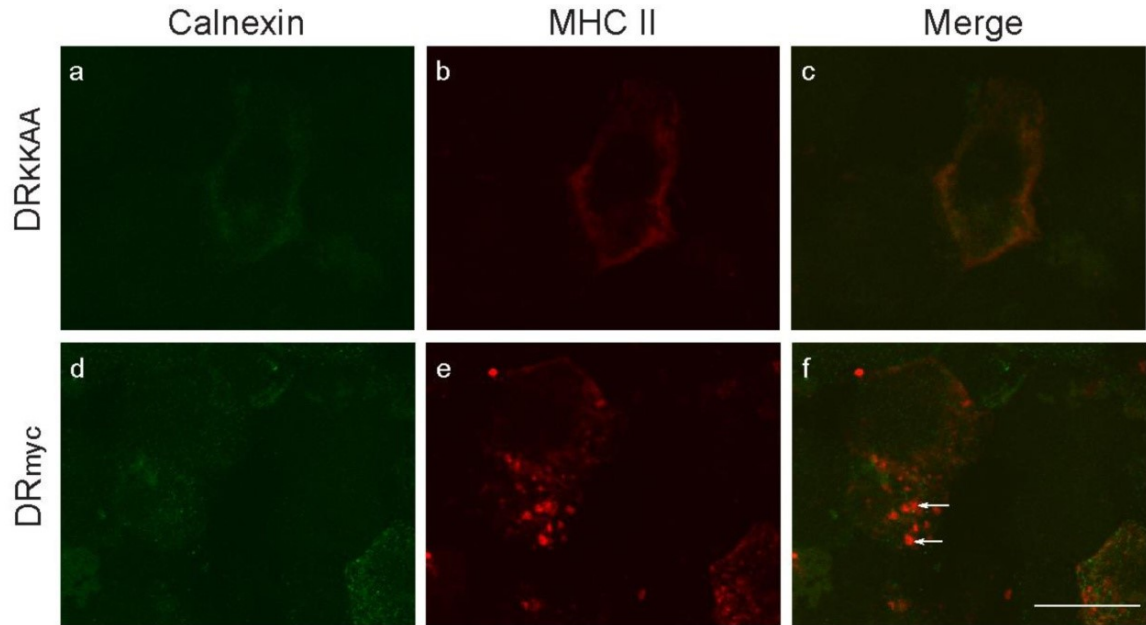
- Cresswell P. Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* 1996; **84**: 505–507.
- Strubin M, Berte C, Mach B. Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *EMBO J* 1986; **5**: 3485–3488.
- Roche PA, Marks MS, Cresswell P. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 1991; **354**: 392–394.



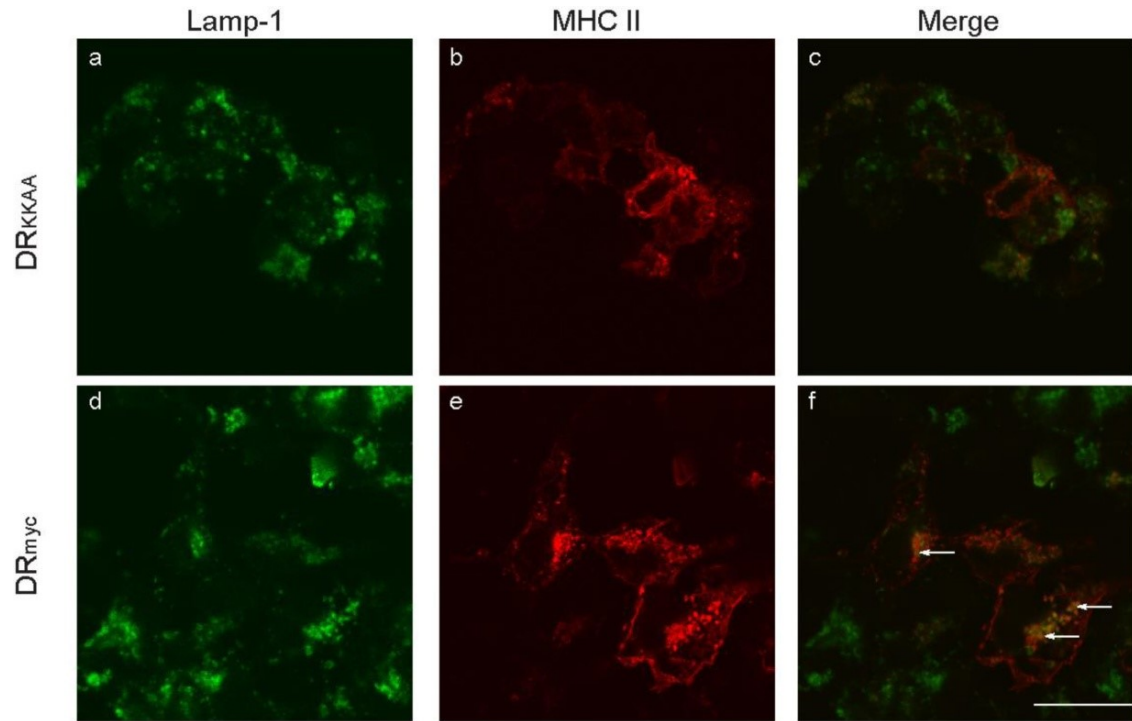
- 4 Lamb CA, Cresswell P. Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes. *J Immunol* 1992; **148**: 3478–3482.
- 5 Strubin M, Long EO, Mach B. Two forms of the Ia antigen-associated invariant chain result from alternative initiations at two in-phase AUGs. *Cell* 1986; **47**: 619–625.
- 6 Schutze M-P, Peterson PA, Jackson MR. An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 1994; **13**: 1696–1705.
- 7 Khalil H, Brunet A, Saba I, Terra R, Sekaly RP, Thibodeau J. The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int Immunol* 2003; **15**: 1249–1263.
- 8 Singer PA, Lauer W, Dembic Z, Mayer WE, Lipp J, Koch N et al. Structure of the murine Ia-associated invariant (Ii) chain as deduced from a cDNA clone. *EMBO J* 1984; **3**: 873–877.
- 9 Cresswell P. Chemistry and functional role of the invariant chain. *Curr Opin Immunol* 1992; **4**: 87–92.
- 10 Riberdy JM, Newcomb JR, Surman MJ, Barbosa JA, Cresswell P. HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* 1992; **360**: 474–477.
- 11 Denzin LK, Cresswell P. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II $\alpha\beta$ dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 1995; **82**: 155–165.
- 12 Majera D, Kristan KC, Neefjes J, Turk D, Mihelic M. Expression, purification and assembly of soluble multimeric MHC class II-invariant chain complexes. *FEBS Lett* 2012; **586**: 1318–1324.
- 13 Koch N, Zacharias M, Konig A, Temme S, Neumann J, Springer S. Stoichiometry of HLA class II-invariant chain oligomers. *PLoS One* 2011; **6**: e17257.
- 14 Teasdale RD, Jackson MR. Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996; **12**: 27–54.
- 15 Khalil H, Brunet A, Thibodeau J. A three-amino-acid-long HLA-DRbeta cytoplasmic tail is sufficient to overcome ER retention of invariant-chain p35. *J Cell Sci* 2005; **118**: 4679–4687.
- 16 Anderson HA, Bergstralh DT, Kawamura T, Blauvelt A, Roche PA. Phosphorylation of the invariant chain by protein kinase C regulates MHC class II trafficking to antigen-processing compartments. *J Immunol* 1999; **163**: 5435–5443.
- 17 Kuwana T, Peterson PA, Karlsson L. Exit of major histocompatibility complex class II-invariant chain p35 complexes from the endoplasmic reticulum is modulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 1056–1061.
- 18 Marks MS, Blum JS, Cresswell P. Invariant chain trimers are sequestered in the rough endoplasmic reticulum in the absence of association with HLA class II antigens. *J Cell Biol* 1990; **111**: 839–855.
- 19 Warmerdam PA, Long EO, Roche PA. Isoforms of the invariant chain regulate transport of MHC class II molecules to antigen processing compartments. *J Cell Biol* 1996; **133**: 281–291.
- 20 Jasanoff A, Song S, Dinner AR, Wagner G, Wiley DC. One of two unstructured domains of Ii becomes ordered in complexes with MHC class II molecules. *Immunity* 1999; **10**: 761–768.
- 21 van LM, McEwen-Smith RM, Benham AM. HLA-DP HLA-DQ, and HLA-DR have different requirements for invariant chain and HLA-DM. *J Biol Chem* 2010; **285**: 40800–40808.
- 22 Veenstra H, Jacobs P, Dowdle EB. Processing of HLA-class II invariant chain and expression of the p35 form is different in malignant and transformed cells. *Blood* 1993; **82**: 2494–2500.
- 23 Yan G, Shi L, Penforis A, Faustman DL. Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells. *J Immunol* 2003; **170**: 620–627.
- 24 Faubert A, Samaan A, Thibodeau J. Functional analysis of tryptophans alpha 62 and beta 120 on HLA-DM. *J Biol Chem* 2002; **277**: 2750–2755.

The Supplementary Information that accompanies this paper is available on the Immunology and Cell Biology website (<http://www.nature.com/icb>)

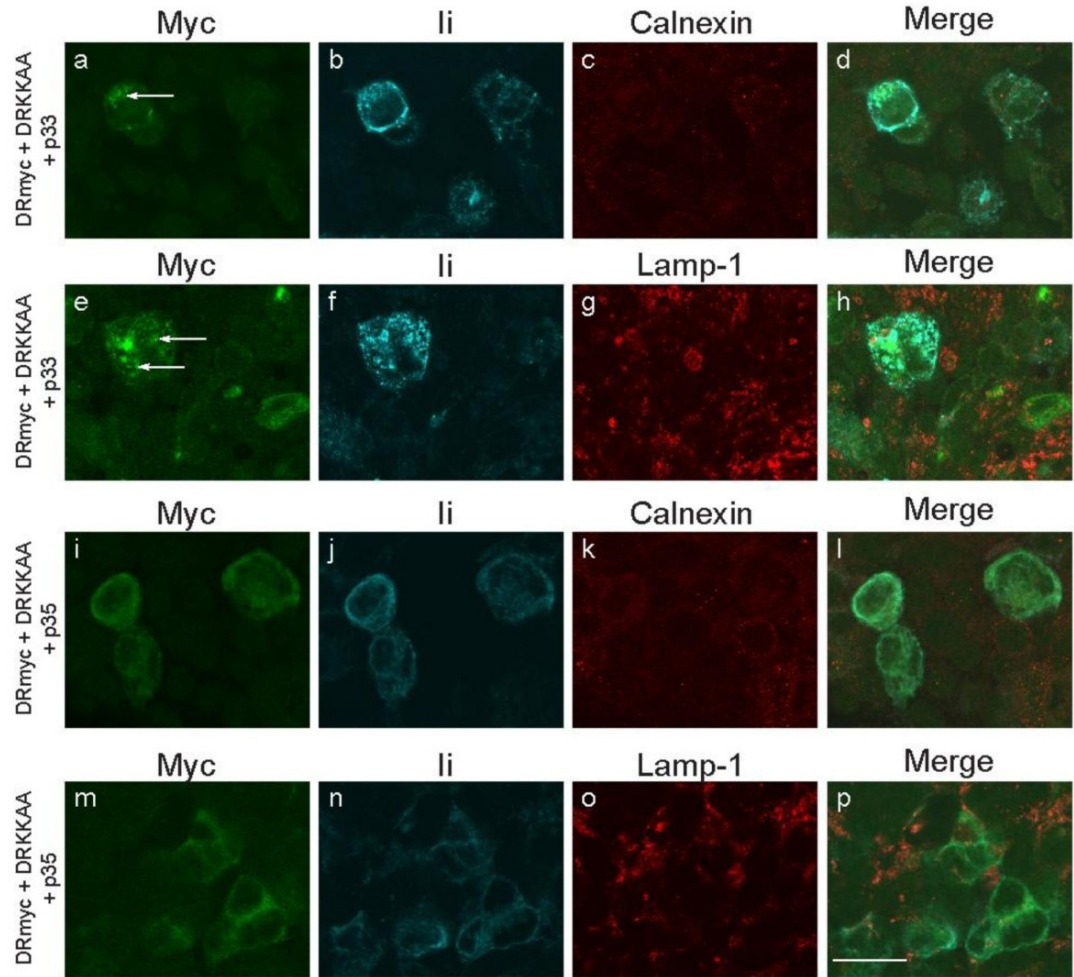
Cloutier et al.



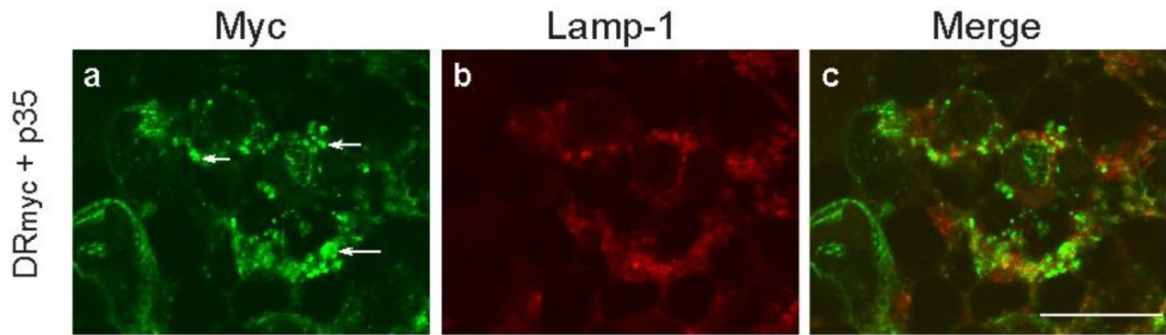
Supplemental Figure 1A. A di-lysine motif at the C-terminus of DR β retains HLA-DR in the ER. HEK 293 cells were seeded on poly-L-lysine-treated coverslips and transiently transfected using HLA-DR α and the p33 isoform of Ii with alternatively DR β KKAA or DR β myc. After 48h, cells were fixed with 4% PFA, permeabilized in 0.05% saponin and stained for calnexin (a, d) and class II (L243) (b, e). The secondary antibodies used were goat anti-rabbit coupled to Alexa Fluor 488 (a, d) and goat anti-mouse IgG2a coupled to Alexa Fluor 568 (b, e). Cells were analyzed by confocal microscopy on a Zeiss LSM 510 Laser Scanning confocal microscope. Panels c and f show the merge of calnexin and MHC class II. Arrows point to vesicular structures. The white scale bar in f corresponds to 10 μ m.



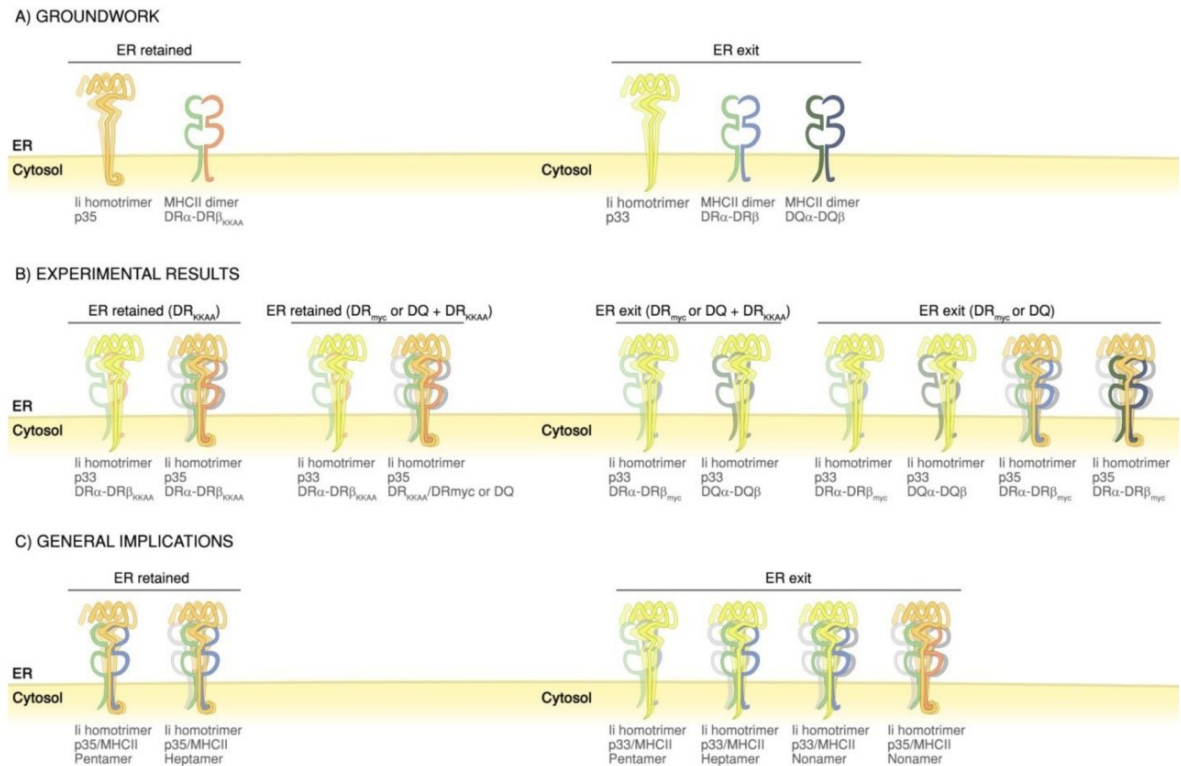
Supplemental Figure 1B. DR_{myc} is found in vesicular structures. HEK 293 cells were seeded on poly-L-lysine-treated coverslips and transiently transfected using HLA-DR α and the p33 isoform of Ii with alternatively DR β KkAA or DR β myc. After 48h, cells were fixed with 4% PFA, permeabilized in 0.05% saponin and stained for Lamp-1 (a, d) and class II (L243) (b, e). The secondary antibodies used were goat anti-mouse IgG1 coupled to Alexa Fluor 488 (a, d) and goat anti-mouse IgG2a coupled to Alexa Fluor 568 (b, e). Cells were analyzed by confocal microscopy on a Zeiss LSM 510 Laser Scanning confocal microscope. Panels c and f show the merge of Lamp-1 and MHC class II. Arrows point to vesicular structures in which Lamp-1 and MHC II colocalize. The white scale bar in f corresponds to 10 μ m.



Supplemental Figure 2A. DRmyc is retained in the ER in the presence of DRKAA and lip35 but not lip33. HEK 293 cells were seeded on poly-L-lysine-treated coverslips and transiently transfected using HLA-DR α , DR β KAA and DR β myc with alternatively the p33 or p35 isoform of li. After 48h, cells were fixed with 4% PFA, permeabilized in 0.05% saponin and stained for Myc (9E10 coupled to FITC) (a, e, i, m), li (Pin.1 coupled to Alexa Fluor 647) (b, f, j, n) and calnexin (c, k) or Lamp-1 (g, o). The secondary antibodies used were and goat anti-rabbit coupled to Alexa Fluor 633 (c, g, k, o). Cells were analyzed by confocal microscopy on a Zeiss LSM 510 Laser Scanning confocal microscope. Panels d and l show the merge of calnexin, li and MHC class II, whereas panels h and p show the merge of Lamp-1, li and MHC II. Arrows point to vesicular structures. The white scale bar in p corresponds to 10 μ m.



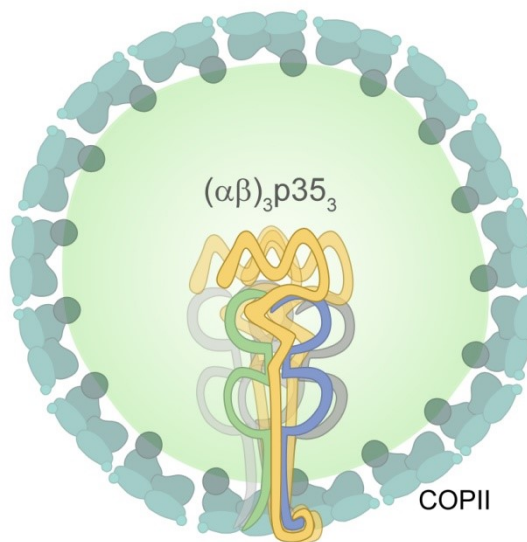
Supplemental Figure 2B. Intracellular localization of DRmyc in the presence of lip35. HEK 293 cells were seeded on poly-L-lysine-treated coverslips and transiently transfected using HLA-DR α , DR β myc and the p35 isoform of li. After 48h, cells were fixed with 4% PFA, permeabilized in 0.05% saponin and stained for Myc (9E10 coupled to FITC) (a) and Lamp-1 (b). The secondary antibody used was a goat anti-rabbit coupled to Alexa Fluor 633 (b). Cells were analyzed by confocal microscopy on a Zeiss LSM 510 Laser Scanning confocal microscope. Panel c shows the merge of MHC class II and Lamp-1. Arrows point to vesicular structures. The white scale bar in c corresponds to 10 μ m.



Supplemental Figure 3 : lip35 promotes formation of nonameric complexes with MHCIIIs

A) Groundwork on MHCII/Ii trafficking has established that while p35 homotrimers are retained in the ER by the RxR motif, Iip33 homotrimers, MHCII DR and DQ exit the ER. A DR mutant bearing the KKAA motif is also retained in the ER. **B)** Our results show that p35 or p33 expressed with DR_{KKAA} are retained in the ER. Meanwhile, expression with WT DR or DQ shows expression at the cell surface. When co-expressed with both DR_{KKAA} and WT DR or DQ, cell surface level of p33/MHCII is reduced suggesting that one part of the pool is retained in the ER (p33/DR_{KKAA}) while the other reaches the cell surface (p33/DR). Co-expression of DR_{KKAA} and WT DR or DQ with p35 shows no cell surface expression of p35/MHCII. **C)** General implications of our model for the formation of Ii/MHCII complexes. Our experiments suggest that while p33 can exit the ER as pentamers, p35 promotes formation of stoichiometric complexes.

2 Article 2: La sortie du RE de l'isoforme p35 de la chaîne invariante requiert une liaison directe avec les molécules de CMHII et est inhibée par le facteur de virulence NleA d'*Escherichia Coli* Entérohémorragique.





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/humimm

Rapid Communication

ER egress of invariant chain isoform p35 requires direct binding to MHCII molecules and is inhibited by the NleA virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*Maryse Cloutier^a, Catherine Gauthier^a, Jean-Simon Fortin^a, Laetitia Genève^a, Kyungho Kim^b, Samantha Gruenheid^c, Jinoh Kim^b, Jacques Thibodeau^{a,*}^a Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Qué., Canada^b Department of Pediatrics, UC Davis Medical Center, M.I.N.D. Institute, Sacramento, CA, USA^c Department of Microbiology and Immunology, McGill Life Sciences Complex, Bellini Pavilion, Montreal, Qué., Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 December 2013

30 September 2014

Accepted 10 February 2015

Available online 27 February 2015

Keywords:

Antigen presentation

COPII

NleA

Di-arginine

Invariant chain

MHC class II

ABSTRACT

Four invariant chain (Ii) isoforms assist the folding and trafficking of human MHC class II (MHCII). The main isoforms, Iip33 and Iip35, assemble in the ER into homo- and/or hetero-trimers. The sequential binding of up to three MHCII $\alpha\beta$ heterodimers to Ii trimers results in the formation of pentamers, heptamers and nonamers. MHCII are required to overcome the p35-encoded di-arginine (RxR) ER retention motif and to allow anterograde trafficking of the complex. Here, we show that inactivation of the RxR motif requires a direct *cis* interaction between p35 and the MHCII, precluding ER egress of some unsaturated Ii trimers. Interestingly, as opposed to MHCII/p33 complexes, those including p35 remained in the ER when co-expressed with the NleA protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Taken together, our results demonstrate that p35 influences distinctively MHCII/Ii assembly and trafficking.

© 2015 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The invariant chain (Ii; CD74) is a type II protein that chaperones MHC class II molecules (MHCII). Humans express four Ii isoforms from the same mRNA precursor: p33, p35, p41 and p43. The longer p35 and p43 isoforms differ from p33 and p41, respectively, by the presence of a 16 amino acid N-terminal extension resulting from the use of an alternative upstream start codon [1]. This cytoplasmic extension encompasses a strong di-arginine (RxR) ER retention motif and two phosphorylation-prone serines [2]. Our group has shown that the RxR motif of p35 is masked by the cytoplasmic tail of the MHCII β chain upon assembly in the ER [3]. In the ER, the various Ii isoforms form homo- and heterotrimers immediately after biosynthesis. Then, MHCII $\alpha\beta$ heterodimers sequentially incorporate Ii trimers, generating pentamers,

heptamers and, ultimately, nonamers [4,5]. It was recently suggested that nonamers are experimental artefacts and that structural constraints might only allow the formation of pentamers [6]. However, half of the Ii pool is part of trimers containing at least one p35 moiety and there is no evidence for the preferential binding of MHCII to p35 over p33 [7]. Thus, in conditions where the MHCII binds the p33 moiety of a p35-containing Ii heterotrimer, this pentamer model implies that the MHCII has to overcome the RxR motif in *trans*. Here, we have addressed the assembly and trafficking of the p35-containing MHCII/Ii complex.

2. Materials and methods

2.1. Plasmids and mutagenesis

The pBudDR and pBudDM plasmids have been described previously [3,8]. Ii (p33 + p35), p33, p35 and p35_{LIML} were subcloned into pcDNA3 (Invitrogen, ON) from previously described constructs [3]. The pcDNA3 p33_{LIML} mutant in which the two leucine-based sorting signals were changed for alanines was created by PCR [3]. pcDNA3.1 YFP was obtained from Invitrogen. pNleA-GFP was previously

Abbreviations: SCD, single chain dimer; RxR, di-arginine motif; ERES, ER exit sites.

* Corresponding author at: Department of Microbiology and Immunology, Université de Montréal, C.P. 6128 succursale Centre-ville, Montréal, Qué. H3C 3J7, Canada. Tel.: +1 514 343 6279; fax: +1 514 343 5701.

E-mail address: jacques.thibodeau@umontreal.ca (J. Thibodeau).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2015.02.002>

0198-8859/© 2015 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

described [9]. To create the pBud α SCD encoding the single-chain dimer, the luminal domains of the mature DR α (amino acids 1–191) was linked by PCR overlap to p33's luminal domain (amino acids 57–232) using a (Gly)₃(Ser)₁(Gly)₃ linker.

2.2. Antibodies and Western blotting

The following mouse mAbs were described previously [3,8]: BU45 (C-terminal region of human Ii); Pin.1 (cytoplasmic tail of human Ii); L243 (HLA-DR); XD5 (DR α /DR β , DR β); CerCLIP.1 (CLIP). For the simultaneous detection of MHCII and Ii, pre-coupled BU45 (Alexa fluor 647) and XD5 (Alexa fluor 488) mAbs were used. Otherwise, Alexa Fluor 488- or 633-coupled goat anti-mouse secondary antibodies were used for flow cytometry (Invitrogen). For Western blotting, peroxidase-AffiniPure goat anti-mouse IgG (H + L) (Jackson ImmunoResearch, PA) was used. For immunoprecipitations, cells were first lysed at 4 °C in 1% Triton-X100. Samples were then subjected to SDS-PAGE. Proteins on immunoblots were detected by chemiluminescence (Roche Applied Science, Qc).

2.3. Cell lines and flow cytometry

For transient expression, HEK 293T cells were transfected using polyethyleneimine (Polyscience, PA) and stained after 48 h. To determine surface expression, live cells were stained on ice and were analyzed by flow cytometry. To determine total expression of MHCII or Ii, cells were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized in 0.5% saponin and stained, as described previously [8]. In some experiments, cells were first surface stained before being permeabilized and stained.

3. Results

3.1. A soluble single-chain dimer between Ii and DR α (α SCD) is expressed at the plasma membrane with DR β

To control the MHCII/Ii stoichiometry, we constructed a soluble Ii/MHC α SCD. To covalently attach MHCII and Ii, the cDNA for the soluble form of DR α was linked to a sequence coding for a flexible gly₃/ser/gly₃ linker and to the coding region of the luminal Ii N-terminus domain (Fig. 1A). This approach maintains intact the trimerization domain of Ii, a prerequisite to allow formation of high-order structures with co-expressed WT Ii units. Soluble Ii molecules were shown to trimerize and form nonamers with soluble MHCIIIs in transfected HEK 293T epithelial cells [10]. Thus, a co-transfected WT p35 will associate with the Ii moiety of α SCD, which is devoid of ER retention motifs. Upon co-expression of DR β , a MHCII $\alpha\beta$ heterodimer will fold around the Ii moiety of the α SCD. As the covalent link between DR α and Ii implies a stoichiometric interaction, no extra MHCII $\alpha\beta$ dimer will be available to bind the co-transfected full length WT lip35. Thus, if a (α SCD/ β)+lip35 complex egresses the ER, it will indicate that the MHCII β chain cytoplasmic tail is dominant and can override in *trans* the ER retention motif of the distant p35 moiety that is not in direct contact with the MHCII.

First, we ascertained that the soluble α SCD was stabilized at the membrane upon interaction with the full-length, transmembrane DR β chain. When transiently co-transfected in HEK 293T cells, the DR β chain and α SCD (α SCD/ β) were both detected at the cell surface using the DR-specific XD5 and Ii-specific BU45 mAbs, respectively (Fig. 1B). As positive control, we used the WT DR α and DR β chains co-expressed with an Ii mutant devoid of its two leucine-based motifs (lip33_{LIML}). The lack of such endosomal sorting signals mimics the situation created by the use of a soluble α SCD construct and results in a greater accumulation of MHCII/Ii

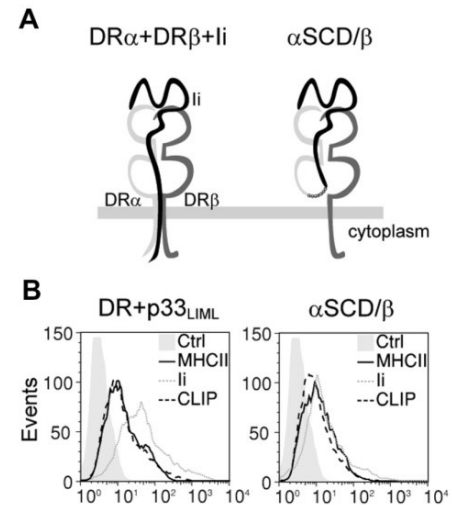


Fig. 1. Schematic representation and trafficking of α SCD. (A) Schematic representation of DR α + DR β + Ii and α SCD/DR β complexes. The α SCD was designed to have Ii and HLA-DR α luminal domains linked by a flexible gly₃/ser/gly₃ sequence. (B) DR (DR α + DR β) + p33_{LIML} and α SCD/ β were transiently transfected in HEK293T cells. After 48 h, cells were stained to detect MHCII, Ii and CLIP using XD5, BU45 and CerCLIP.1 primary mAbs, respectively, followed by an Alexa Fluor 488-coupled goat anti-mouse IgG secondary mAb. Controls (Ctrl) represent mock-transfected cells stained in the same conditions with the MHCII-specific mAb followed by the fluorescent secondary antibody.

complexes at the cell surface [3,11]. The α SCD/ β complex passes through the Golgi and once at the plasma membrane, it is internalized and the Ii moiety is cleaved (data not shown). Transfected cells were recognized by the CerCLIP.1 mAb, which is specific for MHCIIIs associated with the endosomal proteolytic cleavage products of Ii (CLIP) sitting in the peptide-binding groove [12].

3.2. Overcoming the RxR motif requires a direct contact between lip35 and the MHCII

To determine if the RxR motif can be inactivated in *trans*, we expressed p35 together with α SCD/ β . lip33 was used as a control since its interaction with the Ii moiety of α SCD should not prevent ER egress.

First, we ascertained that the co-expressed full-length Ii isoforms were able to complex with α SCD/ β . Cells were co-transfected with α SCD/ β and either p33 or p35. Cells were lysed and a small fraction was used to immunoprecipitate p33 or p35 with Pin.1. The co-immunoprecipitation of DR β was shown on immunoblots and confirmed qualitatively the association of the WT Ii isoforms with α SCD/ β (Fig. 2A). Indeed, DR β did not co-immunoprecipitate when expressed alone with lip33 (Supplemental Fig. 1). A fraction of each cell lysate was included as control. DR β did not co-immunoprecipitate in the absence of p33 or p35 since the α SCD is soluble and not recognized by Pin.1 [4].

Knowing that p35 can associate with α SCD/ β , we could then determine if the sole presence of DR in the complex is sufficient to mask the neighboring RxR motif and to allow transport to the plasma membrane. The use of Ii_{LIML} mutants allows the assessment of both Ii and DR cell surface expression, providing an indirect functional read-out for ER egress [3]. However, as the cell surface display will also depend on the transfection efficiency, we determined in parallel the total Ii and MHCII protein expression by staining permeabilized cells (Fig. 2B). When the mean fluorescence intensities (MFIs) are plotted as the surface expression of a given

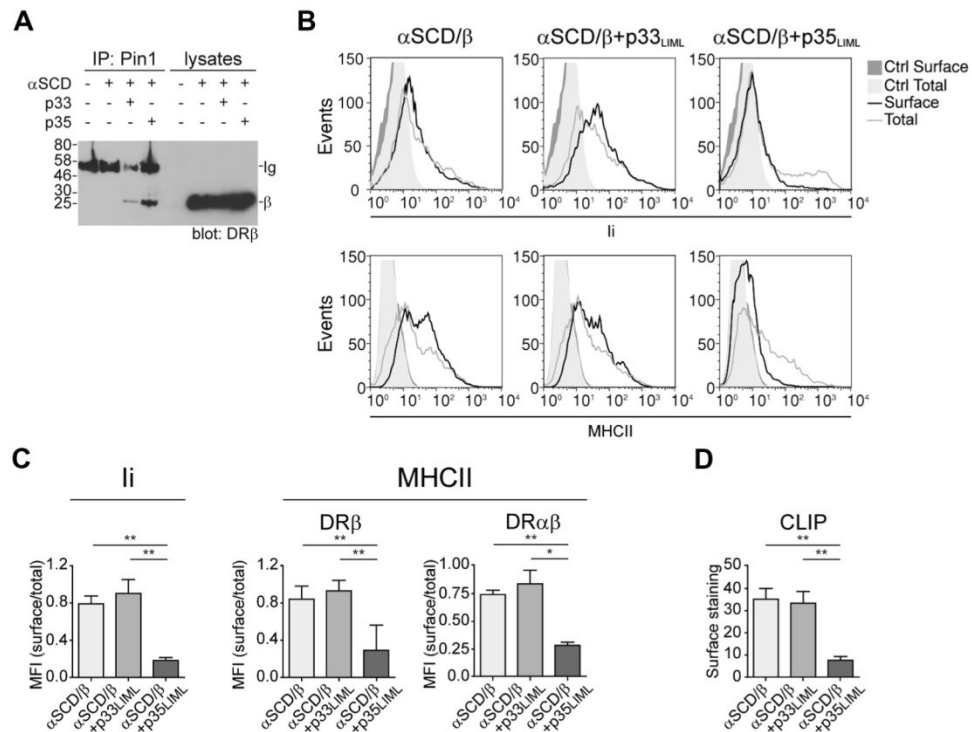


Fig. 2. Masking of the p35 ER retention motif requires a direct association with the MHCIIβ chain. (A) Cells were transfected with αSCD/β alone or with p33 or p35. Cell lysates (right lanes) and samples immunoprecipitated with the li-specific Pin.1 mAb (left lanes) were analyzed on immunoblots for the presence of the DRβ chain (XD5 mAb). Less material was loaded in the third lane from left, as judged by the fact that less of the immunoprecipitating antibody heavy chain is detected at 50 kDa. (B) Cells were transfected with αSCD/β alone or with p33_{LIML} or p35_{LIML}. After 48 h, the cells were permeabilized or not and stained for surface MHCII or li. Control (Ctrl) mock-transfected cells were stained in the same conditions. (C) The MFIs obtained for live or permeabilized cells were plotted as a ratio. DRβ and DRαβ correspond to the values obtained with XD5 and L243, respectively. (D) Cells were stained for the presence of CLIP at the cell surface and the MFIs were plotted. Error bars indicate the SD from five independent experiments. Student's *t*-tests were performed; **p* ≤ 0.05 and ***p* ≤ 0.01.

molecule over its total cellular content (Fig. 2C), the resulting ratios tend to be low for ER-retained molecules [3].

As shown above, in the absence of additional li, αSCD/β was expressed at the plasma membrane and cells stained positive for both BU45 and L243 (Fig. 2B, left panels). As expected, co-expression of p33_{LIML} did not impact on the αSCD/β. Indeed, the surface over total ratios for li (BU45) and MHCII (L243 and XD5) were not affected by the presence of lip33_{LIML} (Fig. 2C). In contrast, upon co-expression of p35_{LIML}, cell surface expression of αSCD/β was greatly reduced and the surface/total ratios were low for li and MHCII, indicating intracellular retention (Fig. 2B and C). Accordingly, the plasma membrane display of CLIP was reduced (Fig. 2D).

The above-described results demonstrate that li can bind αSCD/β. As li trimerization is rapid and precedes MHCII binding [13], the co-transfected li and the li moiety of the αSCD will most likely heterotrimerize (li₁αSCD₂ or li₂αSCD₁). Soon after or in parallel, the MHCII α and β chains fold together around the covalently-linked li, leaving the full length li in the complex but devoid of MHCII chains. The fact that p35 prevented cell surface expression of these complexes indicates that masking must not occur in *trans*, the MHCII having to be in direct contact with p35 to overcome the RxR retention signal.

3.3. p33 and p35 exit the ER through different routes

Unphosphorylated p35 undergoes retrograde transport in COPI coatamers from the ERGIC to the ER [14]. Upon phosphorylation of

p35, 14-3-3 adaptor proteins associate with li and block β-COP binding. However, little is known about the mechanism by which li actually exits the ER. COPII-coated vesicles form at ER exit sites (ERES) where specific cargos are concentrated [15]. Cytoplasmic export signals have been identified in some transmembrane proteins, allowing active recruitment and enrichment into budding vesicles. Other membrane proteins, according to the bulk-flow model, enter various types of vesicles through a default pathway originating at non-specific sites physically distinct from ERES [16].

To gain insights into the transport mode of DR and li isoforms, we perturbed trafficking in the early secretory pathway using the NleA protein from enterohaemorrhagic *E. coli*. One known function of the NleA virulence factor is to bind to Sec24, a main constituent of the COPII protein coat involved in the ER-to-Golgi anterograde transport, and to inhibit COPII-mediated transport [9]. HEK 293T cells were transiently transfected with DR and li, together with NleA-GFP or control YFP. After 48 h, surface expression of DR was monitored by flow cytometry on cells expressing GFP (or YFP) (Fig. 3A). The data reveals that DR, when transfected alone or with lip33_{LIML}, is well expressed at the plasma membrane in NleA-expressing cells. On the other hand, when co-expressed with p35_{LIML}, DR expression was markedly reduced in NleA⁺ versus YFP⁺ cells. However, as cells are not usually p35 exclusive, we performed this assay on cells expressing both li isoforms. As a single cDNA was transfected to produce both p33 and p35, we confirmed on immunoblots that both isoforms were translated (Fig. 3B). Densitometry revealed that there was about 1.5-fold more p35 than p33 in these cells. As p35 is slightly overrepresented, we

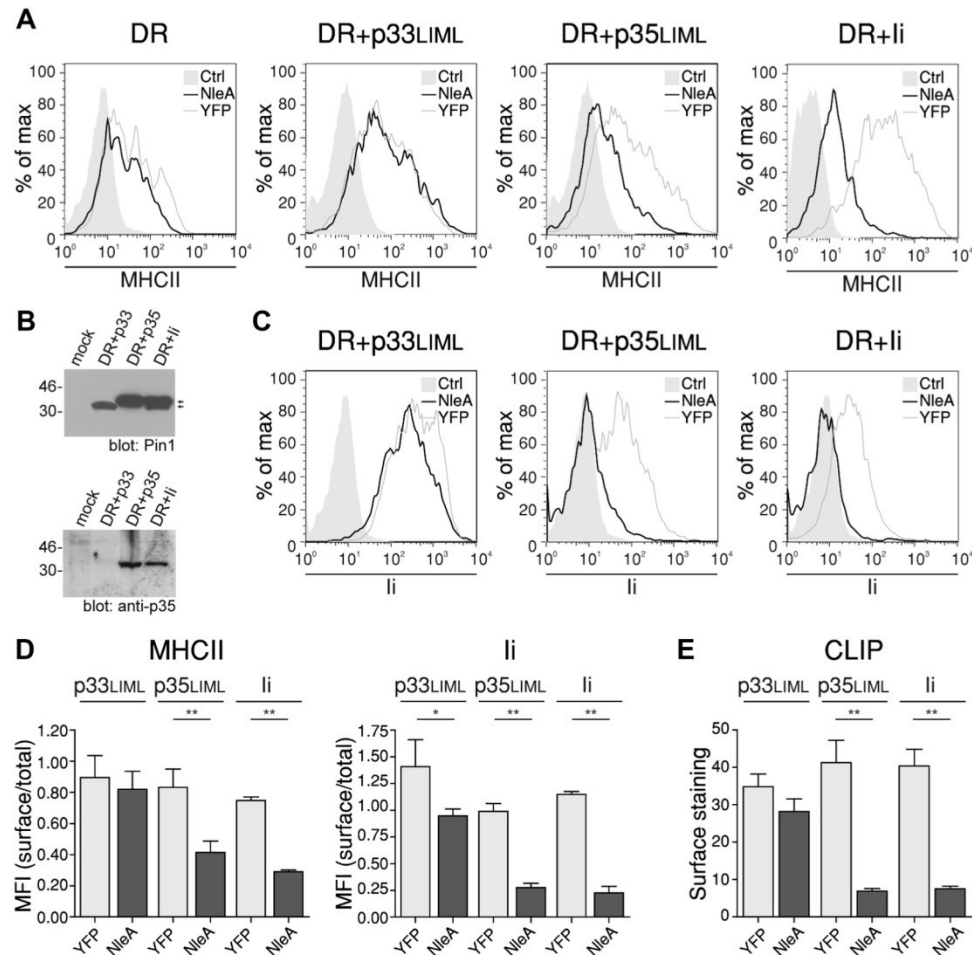


Fig. 3. p33 and p35 exit the ER through different routes. (A) HEK293T cells were transfected with DR (DR α + DR β) together with control YFP or NleA-GFP. Some conditions included p33_{LIML}, p35_{LIML} or li (p33 + p35). After 48 h, cells were analyzed by flow cytometry for the expression, in GFP- or YFP-positive cells, of DR using L243 and secondary Alexa Fluor 633 goat anti-mouse antibody. Histograms are plotted as % of max to account for the differences in transfection efficiencies. The shaded curves (Ctrl) represent the fluorescence background of mock-transfected cells stained in the same conditions. (B) HEK293T cells were mock-transfected or transfected with DR (DR α + DR β) together with p33, p35 or li (p33 + p35). After 48 h, cells were lysed and the expression of li isoforms was analyzed on immunoblots using the Pin.1 mAb specific for both p33 and p35 (upper panel). In addition, cell lysates were analyzed with a rabbit serum specific for the p35 N-terminal 16 amino acids extension (lower panel). Top and bottom arrows show the p35 and p33 isoforms, respectively. Densitometry revealed a relative p35:p33 expression ratio of 3:2. Arrows indicate the position of the two isoforms. (C) Aliquots of cells used in panel A were stained for the expression of li at the cell surface using BU45 and secondary Alexa Fluor 633 goat anti-mouse antibody. (D) The MFIs obtained for live or permeabilized cells were plotted as a ratio for MHCII (XD5) and li (BU45). (E) MFIs obtained for cell surface CLIP (CerCLIP.1 mAb). Error bars indicate the SD from five independent experiments. Paired Student's *t*-tests were performed; **p* \leq 0.05 and ***p* \leq 0.01.

can assume that all li trimers will incorporate at least one p35 moiety. In these conditions, we found that p35 had a negative effect on the surface expression of DR (Fig. 3A). We also monitored li surface expression and the results confirmed the NleA-induced surface down-modulation of lip35-containing complexes (Fig. 3C). The MFIs obtained for surface DR and li were normalized over the total expression of the proteins in permeabilized cells. Fig. 3D demonstrates the significant impact of NleA on the trafficking of p35-containing complexes. Importantly, the absence of CLIP at the cell surface corroborates the negative impact of NleA of the ER egress on this li isoform (Fig. 3E). Indeed, NleA appeared to only slightly affect lip33 surface expression. As there was no down-regulation of MHCII or CLIP, these results may reflect a marginal effect of NleA on MHCII-free li trimers. Altogether, these results confirm the additional layers of complexity in the ER egress of lip35 versus p33. Interestingly, the peculiar structural properties of lip35 render

the MHCII/li complexes susceptible to the negative effects of NleA on protein trafficking to the Golgi.

4. Discussion

Our data best fit a model where a co-expressed full length li associates with α SCD/ β through its trimerization motif, thereby generating pseudo-heptamers (α SCD₂DR β li₁) and -pentamers (α SCD₁DR β li₂). When p35 incorporated the complex, the MHCII were unable to mask its RxR motif, demonstrating the need for a direct contact and the capacity of p35 to force the assembly of large complexes. However, normal cells make a wide variety of heterotrimeric li combinations by mixing the four isoforms. Our results do not rule out that trimers devoid of RxR motifs can also egress the ER loaded with only one (pentamer) or two (heptamer)

MHCII. If stoichiometric variations can influence the functions of MHCII, it remains to be determined. This is particularly relevant in the etiology of B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) where p35 is overexpressed and of type 1 diabetes, where a defect in p35 expression is thought to alter the presentation of disease-related antigens [17,18].

The need to accumulate MHCII on the trimeric Ii backbone until all the p35 moieties are concealed is incompatible with a pentamer-only model [6]. A stoichiometric interaction is also required for ER egress of the octameric (4 α :4 β) ATP-sensitive K⁺ channel where each β chain masks the RxR motif of adjacent β and α subunits. ER egress occurs only when all the motifs are covered and the complex is fully assembled [19]. It is also possible that p35 evolved to regulate surface expression of MHCII-free Ii trimers. Indeed, Ii has signaling properties and receptor functions that might require tight control via p35 expression and phosphorylation [20]. In this context, stoichiometric MHCII variations may be a trivial collateral consequence of the mechanism by which p35 regulates Ii surface levels.

Finally, our results show that ER egress of p35- and/or p43-containing complexes is sensitive to the activity of NleA. Although NleA has been shown to inhibit the transport of COPII-dependent cargos [9], the result of budding experiments did not confirm the inclusion of p35 in such vesicles (Supplemental Fig. 2). This could be due to the limitations of the assay, namely that the reactions only sample a portion of proteins in the ER at steady state or that lip35 needs additional factors that are limiting in our conditions. Also, we cannot rule out that NleA could be having an indirect or off-target effect. Still, the differential behavior of Ii isoforms in the presence of NleA offers the opportunity to shed light on mechanistic principles governing ER egress of RxR-containing protein complexes and, ultimately, to uncover a potential role for NleA in the subversion of antigen presentation by enterohaemorrhagic *E. coli*.

Acknowledgements

We thank Peter Cresswell, Lisa Denzin and Rafick Sékaly for reagents, cells and antibodies. This research was funded by the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC) [grant #298537].

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2015.02.002>.

References

- [1] Strubin M, Berte C, Mach B. Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *EMBO J.* 1986;5:3485–8.
- [2] Schutze M-P, Peterson PA, Jackson MR. An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 1994;13:1696–705.
- [3] Khalil H, Brunet A, Thibodeau J. A three-amino-acid-long HLA-DR β cytoplasmic tail is sufficient to overcome ER retention of invariant-chain p35. *J. Cell Sci.* 2005;118:4679–87.
- [4] Roche PA, Marks MS, Cresswell P. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 1991;354:392–4.
- [5] Lamb CA, Cresswell P. Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes. *J. Immunol.* 1992;148:3478–82.
- [6] Koch N, Zacharias M, König A, Temme S, Neumann J, Springer S. Stoichiometry of HLA class II-invariant chain oligomers. *PLoS One* 2011;6:e17257.
- [7] Anderson HA, Bergstralh DT, Kawamura T, Blauvelt A, Roche PA. Phosphorylation of the invariant chain by protein kinase C regulates MHC class II trafficking to antigen-processing compartments. *J. Immunol.* 1999;163:5435–43.
- [8] Faubert A, Samaan A, Thibodeau J. Functional analysis of tryptophans alpha 62 and beta 120 on HLA-DM. *J. Biol. Chem.* 2002;277:2750–5.
- [9] Kim J, Thanabalasuriar A, Chaworth-Musters T, Fromme JC, Frey EA, Lario PI, et al. The bacterial virulence factor NleA inhibits cellular protein secretion by disrupting mammalian COPII function. *Cell Host Microbe.* 2007;2:160–71.
- [10] Majera D, Kristan KC, Neefjes J, Turk D, Mihelic M. Expression, purification and assembly of soluble multimeric MHC class II-invariant chain complexes. *FEBS Lett.* 2012;586:1318–24.
- [11] Bakke O, Dobberstein B. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 1990;63:707–16.
- [12] Denzin LK, Robbins NF, Carboy-Newcomb C, Cresswell P. Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells. *Immunity* 1994;1:595–606.
- [13] Marks MS, Blum JS, Cresswell P. Invariant chain trimers are sequestered in the rough endoplasmic reticulum in the absence of association with HLA class II antigens. *J. Cell Biol.* 1990;111:839–55.
- [14] O'Kelly I, Butler MH, Zilberberg N, Goldstein SA. Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* 2002;111:577–88.
- [15] Sato K. COPII coat assembly and selective export from the endoplasmic reticulum. *J. Biochem.* 2004;136:755–60.
- [16] Zanetti G, Pahuja KB, Studer S, Shim S, Schekman R. COPII and the regulation of protein sorting in mammals. *Nat. Cell Biol.* 2012;14:20–8.
- [17] Veenstra H, Jacobs P, Dowdle EB. Processing of HLA-class II invariant chain and expression of the p35 form is different in malignant and transformed cells. *Blood* 1993;82:2494–500.
- [18] Yan G, Shi L, Penforis A, Faustman DL. Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells. *J. Immunol.* 2003;170:620–7.
- [19] Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY. A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* 1999;22:537–48.
- [20] Shachar I, Haran M. The secret second life of an innocent chaperone: the story of CD74 and B cell/chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Leuk. Lymphoma* 2011;52:1446–54.

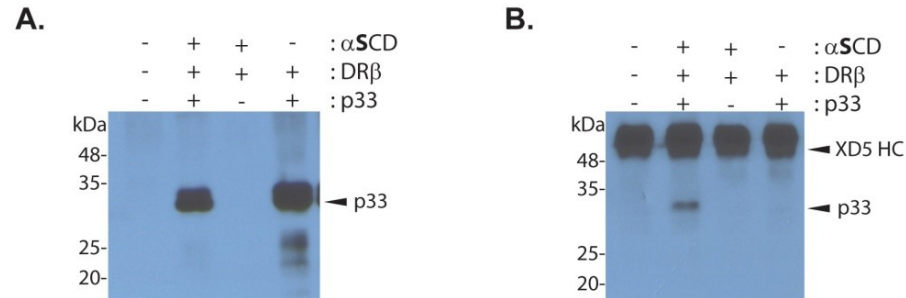


Fig. S1. lip33 interacts with DRβ only in presence of αSCD. (A) HEK 293XT cells were transiently transfected and lysed after 48h. Whole cell lysates were separated in reducing conditions on SDS-PAGE and blotted for li using a combination of D-6 (Genève et al. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. 2014; 33:221-7), a mAb specific for the cytoplasmic tail of li (Santa Cruz Biotechnology Inc.), and HRP-coupled anti-mouse heavy chain antibody (Jackson ImmunoResearch). The arrow points to p33. (B) Protein G sepharose beads (GE Healthcare Bio-Sciences Inc.) were coupled to the XD5 mAb and used to immunoprecipitate DRβ from the lysates described in panel A. Samples were blotted with D-6 as in panel A. Arrows point to p33 and heavy chain of XD5 used for immunoprecipitations.

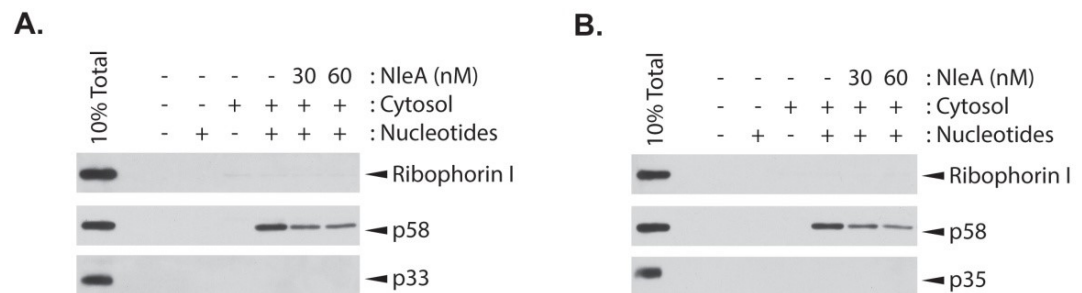
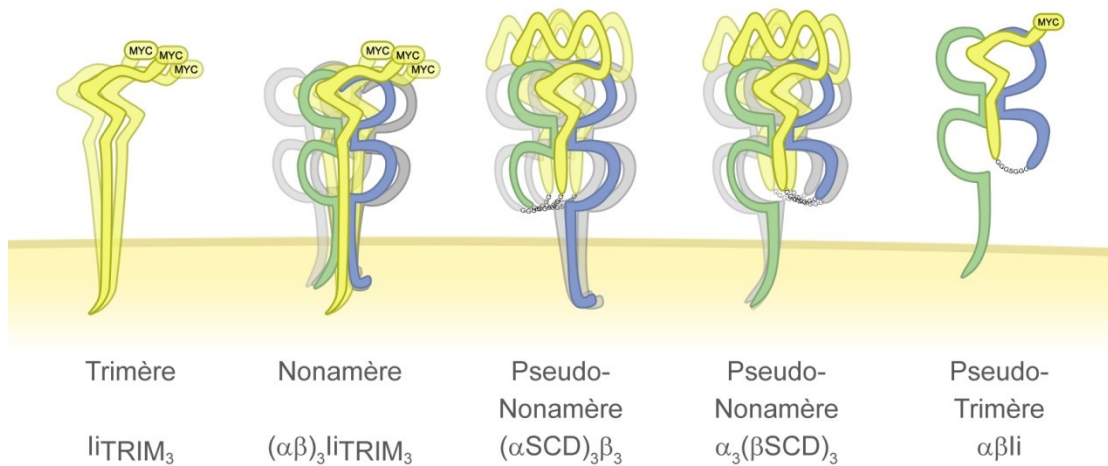


Fig. S2. COPII vesicle formation assay. An in vitro COPII vesicle formation assay was performed as described previously (Kim et al., Cell Host Microbe. 2007; 2:160-71). Semi-intact cells were prepared using HeLa cells stably expressing HLA-DR1 with either p33 (A) or p35 (B). Rat liver cytosol (4 mg/ml final concentration) was used as a source of COPII proteins. Nucleotides include GTP and an ATP regenerating system (Kim et al., Cell Host Microbe. 2007; 2:160-71). Isolated budded vesicle fractions and 10% of the total semi-intact cells (10% total) were solubilized, separated on an SDS-PAGE, and probed for ribophorin I (an ER resident protein), p58/ERGIC53/LMAN1 (an ER-Golgi recycling protein) and li. Ribophorin I should not be found in the vesicle fraction, whereas p58/ERGIC53/LMAN1 should be found in the vesicle fraction in a cytosol and nucleotide-dependent manner. li was not found in the COPII vesicle fraction under the current assay condition.

3 Article 3: Le domaine transmembranaire et la région en C-terminale supportent de façon indépendante la trimérisation de la chaîne invariante et l'assemblage des complexes nonmériques avec les molécules de classe II.



The transmembrane domain and luminal C-terminal region independently support invariant chain trimerization and assembly with MHCII into nonamers

Running title : Invariant chain domains required for nonamerization

Maryse Cloutier¹, Jean-Simon Fortin¹ and Jacques Thibodeau^{1,*}

¹ Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3T 1J4

* To whom correspondence should be addressed : Jacques Thibodeau, Ph.D. :Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, CP 6128 Succ Centre ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7; Jacques.Thibodeau@umontreal.ca; Tel : (514) 343-6279; Fax: (514) 343-5701.

This research was funded by a Discovery grant from the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC; grant number RGPIN/4821-2015) to JT.

ABSTRACT

Invariant chain (CD74, Ii) is a multifunctional protein expressed in a variety of APCs. It assists the ER exit of various cargos and serves as a receptor for the macrophage migration inhibitory factor (MIF). The newly-translated Ii chains trimerize, a structural feature that is not readily understood in the context of its MHCII chaperoning function. Two segments of Ii, the luminal C-terminal region (TRIM) and the transmembrane domain (TM), have been shown to participate in the trimerization process but their relative importance and impact on the assembly with MHCII molecules remains debated. Here, we addressed the requirement of these domains in the trimerization of human Ii (hIi) as well as in the oligomerization with MHCII molecules. We used site-directed mutagenesis to generate series of Ii and DR mutants. These were transiently transfected in HEK293T cells to test their cell surface expression and analyse their interactions by co-immunoprecipitations. Our results showed that the TRIM domain of Ii is not essential for its trimerization nor for intracellular trafficking with MHCII molecules. We also gathered evidence that in the absence of TM, TRIM allows the formation of multi-subunit complexes with DR. Similarly, in the absence of the TRIM, Ii can assemble into high-order structures with MHCII molecules. Altogether, our data show that trimerization of Ii through either TM or TRIM fully sustains nonameric complex formation with MHCII molecules.

INTRODUCTION

Ii is a non-polymorphic type II transmembrane glycoprotein (1, 2). It is mainly expressed in APCs and was originally found associated with MHC class II molecules (MHCII) (3, 4). Ii assists the folding of MHCII $\alpha\beta$ heterodimers and blocks their peptide binding groove to prevent the premature capture of Ags (4, 5). While its role in MHCII $\alpha\beta$ heterodimer assembly and transport is well documented, studies in transfected cells and knockout mice demonstrated the relative cell type- and allele-dependent importance of Ii expression (6-9).

Four Ii isoforms have been described in humans (10, 11). p33 and p41 (named according to their m.w.) differ due to the differential splicing of exon 6b, which encodes an additional 64 aa luminal domain. p35 and p43 also arise from this alternative splicing but they differ from p33 and p41, respectively, by the use of an alternative upstream start codon (10, 11). The additional N-terminal 16 aa found in p35 and p43 encompass a cytoplasmic di-arginine ER retention motif and a PKC-phosphorylable serine (12-15). In its native state, this serine is part of a sequence recognized by β -COP, which mediates retrograde transport from the cis-Golgi to the ER (16). However, phosphorylation triggers the association of 14-3-3, preventing the binding of β -COP and allowing forward transport (16, 17). From the trans-Golgi, the MHCII/Ii complex will reach the endocytic pathway (18-22). Once in endosomes, Ii is sequentially degraded, leaving CLIP into the groove of MHCII. This complex is recognized by the non-classical HLA-DM, which catalyzes the exchange of CLIP for a high-affinity peptide (23, 24).

Best characterized as a MHCII chaperone, recent studies have revealed that Ii is also engaged in a number of other immune functions (25-27). For example, Ii regulates the trafficking of additional proteins, such as CD70, CD1 and MHCI (28, 29). Interestingly, Ii has important biological properties that appear to be independent of its chaperoning activities. Indeed, a pool of

Ii is displayed at the plasma membrane (thereby its CD74 designation) and serves as the receptor for MIF, a function hijacked by *Helicobacter pylori* (30, 31). In light of its multifunctional nature, structural analyses are ongoing and key functional domains of Ii have been exposed. However, its crystal structure has yet to be determined, the major hurdle probably residing in the flexible nature of the membrane-proximal region (32).

Once translated and translocated into the ER, Ii rapidly trimerizes (33-35). The structural basis for such self-association has been studied in mice and humans. Three regions of Ii have been shown to independently associate into trimers. First, a trimeric domain (TRIM) of 27 kDa (aa 118-192 of human p33/p41 encoded by exon 6) is located in the luminal region, just C-terminal of the CLIP region. Biochemical and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy studies on the recombinant fragment have confirmed the capacity of the human TRIM to trimerize (36-38). Second, infrared spectroscopy and deletion studies have demonstrated that the human TM (aa 30-55) can trimerize in the absence of TRIM (39, 40). Accordingly, using biophysical and computational methods, Dixon *et al.*, demonstrated trimerization of the mouse TM in isolation (41). Third, the group of Bakke has used NMR spectroscopy to demonstrate that a synthetic peptide, corresponding to the first N-terminal cytoplasmic 27 aa of hIip33, forms an almost coplanar triple-stranded α -helical bundle (42).

While there is ample experimental and computational evidence that these different regions of Ii can trimerize, their relative importance remains debated. For one, the cytoplasmic region is not believed to play a key role in self-association of full-length Ii. At best, trimerization of the cytoplasmic tail could help stabilize the structure (43). Rather, trimerization of this domain was proposed to facilitate sorting and promote endosomal retention as well as the generation of large endosomes (42, 44). While the TM clearly self-associates, many groups have shown that it

is not essential for trimerization to occur. Also, depending on the experimental system used, its deletion can slightly affect the association with HLA molecules (34, 37, 43, 45). On the contrary, other experimental evidences point to the indispensable nature of TRIM for mouse or human Ii trimerization (34, 36, 43, 46). Nevertheless, the TRIM-less mouse Iip10 proteolytic product found in endosomes has been shown to remain trimeric (47). Importantly, these p10/p12 polypeptides of mice and humans are not only trimeric, they were also shown to remain associated with MHCII molecules as part of a nonameric structure (35, 47). Thus, the relative roles of TM and TRIM in trimerization and the formation of high order structures with MHCII remain controversial. In humans, no study has yet concluded that TM is required, nor that TRIM is dispensable for Ii trimerization in the ER. While some data point to interactions between MHCII and both the TM and TRIM domains, their importance for the folding and nonamer formation remains to be fully characterized (37, 39).

Here, we have revisited these issues using a cellular system that allows assessing the capacity of Ii to trimerize and to associate into high-order structures with MHCII. Our data demonstrate that neither TM nor TRIM are essential for hIi trimerization. In addition, we show that any of these domains is sufficient to trigger the assembly into nonameric structures with MHCII, as long as the Ii moieties involved share the same domain. The implications of these results for Ag presentation by MHCII and for Ii functions in general are discussed.

Material and Methods

Plasmids and mutagenesis

pBud DR, pBud DM, pcDNA3.1 DR α , pBud α SCD, pcDNA3.1 DR β_{myc} and pcDNA3.1 DR β_{KKAA} , pcDNA3 Ii, pcDNA3 p33, pcDNA3 p33_{LIML}, pcDNA3 p35, pcDNA3 p35_{LIML} and pBud Δ 20 Ii have been described previously (48-52). The β single-chain dimer (β SCD) linking the luminal domain of DR β (aa 1-199) to Ii's luminal region (aa 57-232) using a (Gly)₃(Ser)₁(Gly)₃ linker was created as described for α SCD (52). Mutants lacking the TRIM domain (aa Δ 128-216 from p33) were created by PCR overlap extension for p35_{LIML}, Δ 20 and β SCD, giving rise to the pBud p35_{LIML}TRIM, pBud Δ 20_{TRIM} and pBud β SCD_{TRIM}, respectively.

Abs, immunoprecipitation (IP) and Western blot (WB)

The following mouse mAbs were described previously (48, 49): BU45 (C-terminal region of hIi); Pin.1 (cytoplasmic tail of hIi), L243 (HLA-DR); DA6.147 (cytoplasmic tail of DR α) XD5 (DR β); CerCLIP.1 (CLIP); MaP.DM1 (DM); 9e10 (myc tag) (Biolegend, San Diego, CA) and the rabbit anti-CLIP (CLIP region of Ii) (a kind gift from Dr P. Cresswell, Yale University).

Alexa Fluor 488- or 633-coupled goat anti-mouse secondary Ab (Invitrogen, Burlington, ON) were used for flow cytometry. For WB, Peroxidase-AffiniPure goat anti-mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) was used. For IPs, cells were lysed at 4°C in 1% Triton-X100. Lysates were analyzed as controls and all samples were subjected to reducing SDS-PAGE. Proteins on immunoblots were detected by chemiluminescence (Roche Applied Science, Laval, Qué.). For crosslinking experiments, cells were lysed in 1% Triton and 400 μ g/mL DSP (dithiobis (succinimidyl propionate)) (Sigma Aldrich, St-Louis, MO). For Endo H resistance assays, total lysates were treated with Endo H (New England Biolabs), according to the

manufacturer's recommendations. Proteins were analyzed in non-reducing conditions by SDS-PAGE.

Cell lines and flow cytometry

For transient expression, HEK293T cells were transfected using polyethyleneimine (Polyscience, Warrington, PA) and stained after 48h. To determine surface expression, live cells were stained on ice and analyzed by flow cytometry on a FACSCalibur or FACSCantoII. To determine total expression of MHCII and Ii, cells were fixed in 4% paraformaldehyde, permeabilized, and stained, as described previously (48). Forward and side scatter gating strategy was used to gate on single cells.

RESULTS

Formation of Ii trimers in absence of the TRIM domain

Conflicting data exist in the literature regarding the importance of the TRIM motif of Ii in trimer formation as well as its relevance in the trafficking of MHCII-Ii complex (39, 41, 43, 46). First, we asked if deletion of TRIM could affect the formation of hIi trimers in living cells. To address this question, we used a truncated version of p35 that preserves its glycosylation sites but lacks the three C-terminal α -helices forming the TRIM domain (Fig. 1A) (37, 38). HEK293T cells were transiently transfected with either the wild-type (WT) p35, p35 lacking its endosomal sorting signals (p35_{LIML}) or p35 lacking the TRIM motif and the sorting signals (p35_{LIMLTRIM}). Mutation of the two leucine-based endosomal localization motifs favors the accumulation of Ii at the plasma membrane in the presence of MHCII molecules, thus providing a simple, indirect flow cytometry readout for ER egress (50-52). For the flow cytometry detection of p35_{LIMLTRIM}, which has lost both its luminal and cytoplasmic epitopes recognized by the BU45 and Pin.1 mAb, respectively, a myc tag was introduced at the C-terminal end.

The capacity of these individual molecules to homotrimerize was tested in transfected cells treated with the crosslinking agent DSP. After cell lysis, proteins were analyzed by WB using a polyclonal rabbit Ab recognizing the CLIP core sequence common to all constructions. p35 and p35_{LIML} were detected in complexes of various m.w., in line with their incorporation in dimers and trimers (Fig. 1B). Interestingly, p35_{LIMLTRIM} also migrated as dimers and trimers. We noted that a substantial amount of monomers remained in these conditions. This is most likely due to the fact that p35_{LIMLTRIM} protein is shorter than WT Ii and, thus, contains less primary amines that can be modified. To confirm that p35_{LIMLTRIM} can form high-order complexes, we tested by co-IP its ability to associate with WT Ii. HEK293T cells were transiently transfected with either

p35, p35_{LIMLTRIM} or both p35 and p35_{LIMLTRIM}. Cells were lysed and the TRIM mutant was immunoprecipitated using the 9e10 Ab against the myc tag (Fig. 1C). This Ab did not bring down p35 unless the p35_{LIMLTRIM} molecule was co-expressed, in line with the above-described results of crosslinking experiments showing dimers and trimers of p35_{LIMLTRIM} (Fig. 1B). Altogether, our data suggest that the TM is sufficient to allow the trimerization of hIi.

Ii's TRIM motif is not necessary for binding to MHCII molecules and to egress the ER

We next asked whether deletion of TRIM could prevent the interaction of Ii with MHCII. As p35 does not exit the ER on its own, we tested the capacity of DR to assist surface expression of p35 and p35_{LIMLTRIM}. As controls, we used Ii mutants devoid of their cytoplasmic tail ($\Delta 20$) and TRIM domain ($\Delta 20_{\text{TRIM}}$) (Fig. 2A). These constructs were separately transiently expressed in HEK293T cells alone (Fig. 2B) or with DR (Fig. 2C). Cells were stained for the presence of Ii at the plasma membrane (surface) using BU45 (Fig. 2B and C, left panels) or 9e10 (Fig. 2B and C, right panels) mAbs. A fraction of the cells was permeabilized (total) before staining to ascertain expression of the Ii protein in conditions where surface expression was negative. The results clearly show that in the absence of DR, only the $\Delta 20$ constructs were gaining access to the plasma membrane. Those Ii proteins that include a RxR motif are prevented from ER egress. However, DR rescued expression at the cell surface of all p35-based proteins, independent of the presence of TRIM. These results demonstrate that the TRIM domain is not required for Ii to associate with MHCII molecules.

Next, we ascertained that the Ii-MHCII interaction was genuine and that the complex could interact with DM. While Ii can bind different regions of MHCII molecules (35, 37, 53, 54), the groove of DR is a major binding site that accommodates the CLIP₈₉₋₁₀₁ aa region, just like any

other nominal Ag (55). Indeed, cell surface staining with the CerCLIP.1 mAb revealed the presence of CLIP at the cell surface (Fig. 2D). Interestingly, upon co-transfection of DM, CLIP was efficiently removed. These results show that in the absence of TRIM, both truncated p33 and p35 can still form trimers. When loaded with MHCII, they egress the ER and serve as substrates for lysosomal degradative enzymes that generate CLIP.

No region other than TM or TRIM can support the formation of high-order complexes

The above-described experiments demonstrate that the TM region of hIi can support the formation of trimers. Next, we confirmed the importance of TM using a different experimental system where the luminal β chain was covalently linked to the extracellular region of Ii, thereby eliminating transmembrane anchors (Fig. 3A). This linkage is possible because DR β and Ii are type I and II proteins, respectively (56). This single chain dimer (SCD) construct, when co-expressed with DR α , allows us to study the impact of different regions of a co-expressed Ii. Thus, we postulated that while p35 would retain this pseudo MHCII/Ii complex (DR α + β SCD), a TRIM-less p35 variant unable to associate with the Ii moiety of the SCD would have no impact on intracellular sorting.

First, we characterized the intracellular trafficking of β SCD. The covalent linkage of Ii and DR β chain may prevent the problems encountered in a previous study where a TM-deleted form of Ii showed altered binding to MHCII (34). When co-expressed with DR α , WB analysis of cell lysates demonstrate that a fraction of the recombinant β SCD protein becomes EndoH resistant (Fig. 3B, open arrow head). Interestingly, the anti-DR β chain-specific mAb also detected a fully EndoH-resistant fragment (filled arrow head) migrating slightly faster than the WT DR β chain (arrow) (Fig. 3B). This fragment most likely represents the DR β moiety of the

SCD that remains following the degradation of Ii in endosomes. These observations suggest that the SCD is properly folded, exits the ER and crosses the Golgi en route to the endosomes where Ii is degraded. Indeed, figure 3C shows that this chimeric protein is well expressed at the plasma membrane and ultimately generates CLIP/MHCII complexes (Fig. 3C, left panel), which serve as substrates for DM (Fig. 3C, right panel).

Then, the DR α + β SCD molecule was co-expressed with either p33 or p35. These WT Ii isoforms can form heterotrimers with the Ii moiety of the β SCD. Indeed, IP of the full-length Ii isoforms with the cytoplasmic tail-specific Pin.1 mAb showed the presence of both WT DR α and the recombinant β SCD, the latter being detected with the XD5 mAb directed at the β 1 domain (Fig. 3D, E).

Interestingly, p35 prevents expression of DR α + β SCD at the plasma membrane, as shown by the absence of CLIP, MHCII and Ii on co-transfected cells (Fig. 3F-H, middle columns). This is due to the lack of a DR β tail capable of masking the p35 ER retention motif (49, 52). Importantly, a TRIM-less p35 couldn't prevent surface expression of DR α + β SCD, in line with the need for this domain in the interaction with the Ii moiety of β SCD (Fig. 3F-H, right columns). Finally, we repeated these experiments using WT p35 co-expressed with a β SCD devoid of its TRIM (Fig. 4A, B). Again, the lack of bidirectional TRIM-dominating interactions prevented the interaction between p35 and β SCD, as judged by the presence of the latter at the plasma membrane (Fig. 4C-E).

The TRIM domain of Ii is not required for the formation of nonameric complexes

We have recently demonstrated that a p35 entity inside any given Ii hetero- or homotrimer must be interacting in cis with a MHCII $\alpha\beta$ heterodimer to see its ER retention motif

inactivated (52). For example, in the same complex, a MHCII molecule that binds a p33 subunit cannot overcome (in trans) the RXR motif of an adjacent, MHCII-free, p35 subunit. In light of these observations, the above-described results clearly demonstrate that MHCII/Ii nonamers exist since p35_{LIML}, when expressed as a single Ii entity, was detected at the plasma membrane in the presence of DR. While our results suggest that TRIM is not necessary for the formation of nonamers, we cannot formally exclude that p35_{LIML} trimers could have dissociated in the presence of DR, therefore trafficking as downgraded (DR $\alpha\beta$)₁/Ii₁ complexes.

Thus, we relied on a complementary *in vivo* approach to investigate the importance of TRIM in the generation of high-order complexes. We made use of an DR molecule harbouring a C-terminal di-lysine-based (KKAA) ER retention motif on its β chain (DR β _{KKAA}) (Fig. 5A). (51) When expressed with DR α , DR β _{KKAA} formed an MHCII heterodimer (DR_{KKAA}) that was shown to localize in the ER. As opposed to the RxR signal of Ii, which is masked by MHCII molecules, the KKAA motif dominates and cannot be overcome by associated molecules. In the absence of Ii, when co-expressed in HEK293 cells together with a WT DR, DR_{KKAA} did not affect the cell surface levels of the latter as the two do not interact (51). However, when Ii is present, this DR_{KKAA} is expected to retain any other class II molecule that happens to be included in the same heptameric or nonameric complex. Consequently, the rationale behind the use of DR_{KKAA} is that it will prevent surface expression of co-expressed WT DR molecules only if the TRIM-less Ii variant p35_{LIML} can form stable trimers that do not fall apart upon MHC II binding. Thus, we expressed separately or together WT DR and DR_{KKAA} in the presence of p35_{LIML}. As a control, we used an Ii variant devoid of the RxR and LI/ML cytoplasmic motifs (Δ 20_{TRIM}). Transfected cells were analysed for the expression of DR and Ii at the plasma membrane by flow cytometry. A fraction of the cells was also permeabilized to calculate the surface over total mean

fluorescence intensity (MFI) ratio. This allows us to ascertain expression of molecules retained intracellularly and to compare indirectly the efficiency of ER egress (Fig. 5B, C).

In the case of $\Delta 20_{\text{TRIM}}$, when the control DR was expressed as the sole MHCII, DR and Ii were both detected at the plasma membrane (Fig. 5B, C). Also, a substantial amount of DR/CLIP complexes were detected at the cell surface, confirming genuine association between MHCII and Ii (Fig. 5D). In contrast, when co-transfected with DR_{KKAA}, very little $\Delta 20_{\text{TRIM}}$ was able to make it to the plasma membrane and, as those molecules that escaped retention by DR_{KKAA} trafficked on their own, no CLIP/DR complexes could be detected (Fig. 5B, D). Interestingly, when the two DR were co-expressed with $\Delta 20_{\text{TRIM}}$, we found some Ii and MHCII molecules at the plasma membrane. Also, the presence of CLIP demonstrates that DR/ $\Delta 20_{\text{TRIM}}$ complexes gained access to the endocytic pathway and thus were free of DR_{KKAA}. These findings suggest that in the presence of $\Delta 20_{\text{TRIM}}$, the WT DR-based MHCII molecules most likely assemble independently from DR_{KKAA}, and can egress independently as pentamers $\alpha\beta(\Delta 20_{\text{TRIM}})_3$.

Given that all three RxR motifs must be masked in a p35 homotrimer, p35 can only egress as part of a nonameric MHCII/Ii complex (52). Thus, we tested the behaviour p35_{LIMLTRIM} in this experimental system. Our results show that the DR was found at the plasma membrane together with Ii and CLIP when expressed with p35_{LIMLTRIM} (Fig. 5B-D). As expected, DR_{KKAA} retained the p35_{LIMLTRIM} as this mutant cannot egress on its own. Accordingly, no CLIP was present at the cell surface. Interestingly, when p35_{LIMLTRIM} was expressed with both DR and DR_{KKAA}, no class II, Ii or CLIP was found at the cell surface. Since DR and DR_{KKAA} are incorporated randomly and if TRIM-deficient Ii constructs can form nonamers, it is likely that every p35_{LIMLTRIM} homotrimer will recruit at least one DR_{KKAA} molecule, thereby preventing ER egress and causing retention of the associated DR. Indeed, our results show that DR_{KKAA}

prevents the expression of DR in the presence of p35_{LIML}TRIM, confirming that TRIM is not required for Ii and MHC II molecules to associate into nonamers (Fig. 5B).

The TRIM supports the scaffolding of nonamers in the absence of Ii's TM.

Experiments using soluble forms of Ii and MHCII molecules have demonstrated the formation of complexes of various stoichiometry (45). We have addressed the role of TM in the assembly with MHCII in transfected cells. First, we deleted the TM of Ii and to ascertain the efficient binding of the Ii CLIP region into the peptide-binding groove of DR, we used a recently described α SCD (Fig. 6A) (52). When expressed on its own in HEK293T cells, the α SCD remains EndoH sensitive and is most likely trapped in the ER (Fig. 6B). As expected, when co-transfected with DR β , the α SCD is strongly expressed and a large proportion becomes EndoH-resistant (arrowhead, Fig. 6B). Also, an EndoH-resistant degradation product was detected (arrow, Fig. 6B), in line with the ER/Golgi egress of the α SCD/ β complex and the endosomal processing of the Ii moiety. Accordingly, CLIP, Ii and DR were all detected at the plasma membrane by flow cytometry using specific Ab (Fig. 6C-E, left columns). However, when the α SCD was co-transfected instead with the DR β _{KKAA} chain, the complex was not found at the cell surface (Fig. 6C-E). Interestingly, when α SCD, DR β _{KKAA} and WT DR β were all co-expressed, there was no CLIP, Ii or DR at the plasma membrane (Fig. 6C-E, right columns). Thus, the stochastic incorporation of the two β chains into heptamers or nonamers results in the retention of all molecules by the DR β _{KKAA}. We conclude that Ii molecules devoid of their TM can still assemble into multimeric structures regrouping multiple MHCII molecules.

Discussion

Newly translated full-length Ii chains swiftly trimerize upon translocation into the ER (33, 36). The need for such self-association is unclear. Data accumulated so far, including those presented here, lead to the conclusion that two distinct regions, highly conserved and encoded by separate exons, can mediate self-recognition of Ii. Besides its chaperone function, free Ii has been shown to accumulate on the plasma membrane, principally on APCs (57, 58). At least three different functions of this pool of cell surface Ii/CD74 have been characterized. First, Ii serves as a receptor for MIF (30). While both the ligand and receptor are trimeric, modeling studies point to a possible dodecameric structure where each Ii moiety binds a MIF trimer (59). Future studies should address the need for these interactions in the generation of a signaling platform, which includes CD44, capable of activating MAPK and to trigger production of pro-inflammatory cytokines (60). Crosslinking of CD74 also leads to the intramembrane cleavage and the release of the intracellular domain (ICD) (61, 62). This short domain enters the nucleus and modulates the transcriptome of APCs (63). While peptides corresponding to the cytoplasmic domain of Ii has been shown to trimerize (42), the structural basis underlying the nuclear activity of the ICD is unknown. In the context of full length Ii, the formation of a trimeric cytoplasmic structure was shown to be essential for shaping endosomes morphology. It was demonstrated that a dimeric structure was non-functional in that respect (44). As this activity of Ii is thought to be important for Ag presentation, it may explain in part the need for trimerization (64). Thus, it is likely that a multi-functional Ii requires multiple trimerization domains, including an extracellular one (TRIM) to rigidify an otherwise unstructured Ii membrane-proximal region and to create a MIF binding domain. While the exon 6b-encoded polypeptide is C-terminal to these trimerization sites, it does not appear to affect the overall stoichiometry (65). However, the N-terminal extension of p35/p43 could modulate enlargement of endosomes or gene expression, two issues

that will require further investigations. Also, the capacity of p35 to possibly interact specifically with COPII vesicles and fine tune ER egress remains to be addressed (52).

When considering the chaperone role of Ii, the need for trimerization in the context of MHCII transport is not readily apparent. Nonameric complexes ($\alpha\beta\text{Ii}$)₃ were first described in the early 1990s and are a direct consequence of Ii's ability to form trimers (33). However, in 2011, it has been proposed that due to structural constraints, Ii/MHCII complexes can only exist as pentamers $\alpha\beta(\text{Ii})_3$ (66). While our results confirmed that pentamers are likely to exit the ER, we have also clearly demonstrated that the ER retention motif of p35 promotes the formation of nonameric structures (51, 52). Indeed, there must be a direct interaction between p35 and the MHCII to inactivate the ER retention signal, thus forcing the addition of $\alpha\beta$ heterodimers until all RxR motifs are matched (60, 67). Mice don't express p35 and we must envisage that an alternative regulatory checkpoint predominates. Early work by the group of Cresswell had shown that calnexin remains bound to the complex until the Ii trimer is fully saturated with MHCII (68). This mechanism may be more stringent in mice than in humans in preventing "premature" egress of pentamers and heptamers (69).

Beyond the debate regarding the stoichiometry of the complexes leaving the ER, the need for multimerization of MHCII in Ag presentation remains nebulous. At one extreme, Ii was even shown to be dispensable for MHCII assembly/trafficking in some cell lines and knockout mice (6, 70, 71). This is certainly non-physiological as MHCII and Ii are co-expressed and the latter is usually found in vast excess (72). Few studies have addressed the importance of TRIM and TM in Ag presentation. Deletion experiments of either domain have produced variable results and stoichiometry of the resulting complexes has not always been thoroughly monitored. On one hand, Germain has shown that truncation of Ii after CLIP does not alter MHCII assembly,

trafficking and peptide acquisition, suggesting that TRIM is not a prerequisite for Ag presentation (73). However, this study did not address the trimeric nature of the truncated Ii. On the other hand, in mice, Koch and collaborators found that Ii oligomer formation through the C-terminal region is needed for HEL presentation (46).

No study has tackled the systematic comparison of Ag presentation efficiency using Ii $\alpha\beta$, Ii $_3\alpha\beta$ or (Ii $\alpha\beta$) $_3$ complexes. The difficulty resides in our capacity to generate structurally comparable complexes of defined stoichiometry. In our recent studies, we made use of the α SCD and the results suggested that the TM of Ii is not required in living cells for the formation of Ii/MHCII complexes of variable stoichiometry. Here, we have confirmed these results and extended the conclusions to the TRIM of hIi. Also, we have shown that no region other than the TM or TRIM (or even MHCII themselves) promote Ii self-association. By using SCDs devoid of TRIM, we were able to compare the trafficking of Ii $_1\alpha_1\beta_1$ with WT nonameric Ii $_3\alpha_3\beta_3$ complexes. While we have not monitored Ag presentation per se, the capacity of all these constructs to generate MHCII/CLIP complexes and to interact with DM suggest that they are structurally and functionally similar. Interestingly, the group of Hirano has recently provided evidence that HLA-DP β allotypes bearing a glycine at position 84 (DP^{84Gly}), such as DP4, do not bind Ii through CLIP (74). They further showed that this MHCII molecule cannot form nonamers and rather engages Ii in a Ii $_1(\alpha\beta)_1$ complex. While Ii chaperones DP4 to the endocytic pathway, more studies will be needed to determine if this peculiar stoichiometry plays a role in the potential association of these alleles with autoimmune diseases (75).

In conclusion, the purpose of the two distinct trimerization domains of Ii in the chaperoning of MHCII remains an open question. As mentioned above, it is possible that the luminal TRIM serves some MHCII-independent functions and that the structural features

required for Ii to chaperone other cargos are dependent on TRIM. Future structure-function studies addressing the interaction of Ii with additional molecules, such as CD70 and possibly CD1d, should shed light on this issue (76-78).

Acknowledgements

We thank Dr P. Cresswell for Abs and Dr H. Khalil for making the p35_{LIMLTRIM} and Δ 20_{TRIM} constructs.

References

1. Strubin, M., B. Mach, and E. O. Long. 1984. The complete sequence of the mRNA for the HLA-DR-associated invariant chain reveals a polypeptide with an unusual transmembrane polarity. *EMBO J* 3: 869-872.
2. Singer, P. A., W. Lauer, Z. Dembic, W. E. Mayer, J. Lipp, N. Koch, G. Hammerling, J. Klein, and B. Dobberstein. 1984. Structure of the murine Ia-associated invariant (Ii) chain as deduced from a cDNA clone. *EMBO J* 3: 873-877.
3. Charron, D. J., and H. O. McDevitt. 1979. Analysis of HLA-D region-associated molecules with monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76: 6567-6571.
4. Jones, P. P., D. B. Murphy, D. Hewgill, and H. O. McDevitt. 1979. Detection of a common polypeptide chain in I-A and I-E sub-region immunoprecipitates. *Mol Immunol* 16: 51-60.
5. Busch, R., I. Cloutier, R.-P. Sekaly, and G. J. Hammerling. 1996. Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 15: 418-428.
6. Sekaly, R.-P., C. Tonnelles, M. Strubin, B. Mach, and E. O. Long. 1986. Cell surface expression of class II histocompatibility antigens occurs in the absence of the invariant chain. *J. Exp. Med* 164: 1490-1504.
7. Bikoff, E. K., L.-Y. Huang, V. Episkopou, J. van Meerwijk, R. N. Germain, and E. J. Robertson. 1993. Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J. Exp. Med* 177: 1699-1712.
8. Rovere, P., F. Forquet, V. S. Zimmermann, J. Trucy, P. Ricciardi-Castagnoli, and J. Davoust. 1997. Dendritic cells from mice lacking the invariant chain express high levels of membrane MHC class II molecules in vivo. *Adv. Exp. Med. Biol* 417: 195-201.
9. Zimmermann, V. S., P. Rovere, J. Trucy, K. Serre, P. Machy, F. Forquet, L. Leserman, and J. Davoust. 1999. Engagement of B cell receptor regulates the invariant chain-dependent MHC class II presentation pathway. *J. Immunol* 162: 2495-2502.
10. Strubin, M., C. Berte, and B. Mach. 1986. Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *EMBO J* 5: 3485-3488.
11. O'Sullivan, D. M., D. Noonan, and V. Quaranta. 1987. Four Ia invariant chain forms derive from a single gene by alternative splicing and alternate initiation of transcription/translation. *J. Exp. Med* 166: 444-450.
12. Lotteau, V., L. Teyton, A. Peleraux, T. Nilsson, L. Karlsson, S. L. Schmid, V. Quaranta, and P. A. Peterson. 1990. Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* 348: 600-605.
13. Lamb, C. A., J. W. Yewdell, J. R. Bennink, and P. Cresswell. 1991. Invariant chain targets HLA class II molecules to acidic endosomes containing internalized influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 5998-6002.
14. Schutze, M.-P., P. A. Peterson, and M. R. Jackson. 1994. An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* 13: 1696-1705.

15. Anderson, H. A., and P. A. Roche. 1998. Phosphorylation regulates the delivery of MHC class II invariant chain complexes to antigen processing compartments. *J. Immunol* 160: 4850-4858.
16. Kuwana, T., P. A. Peterson, and L. Karlsson. 1998. Exit of major histocompatibility complex class II-invariant chain p35 complexes from the endoplasmic reticulum is modulated by phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95: 1056-1061.
17. O'Kelly, I., M. H. Butler, N. Zilberberg, and S. A. Goldstein. 2002. Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* 111: 577-588.
18. Peters, P. J., J. J. Neefjes, V. Oorschot, H. L. Ploegh, and H. J. Geuze. 1991. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 349: 669-676.
19. Roche, P. A., C. L. Teletski, E. Stang, O. Bakke, and E. O. Long. 1993. Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8581-8585.
20. Benaroch, P., M. Yilla, G. Raposo, K. Ito, K. Miwa, H. J. Geuze, and H. L. Ploegh. 1995. How MHC class II molecules reach the endocytic pathway. *EMBO J* 14: 37-49.
21. Castellino, F., and R. N. Germain. 1995. Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. *Immunity* 2: 73-88.
22. Peters, P. J., G. Raposo, J. J. Neefjes, V. Oorschot, R. L. Leijendekker, H. J. Geuze, and H. L. Ploegh. 1995. Major histocompatibility complex class II compartments in human B lymphoblastoid cells are distinct from early endosomes. *J. Exp. Med* 182: 325-334.
23. Riberdy, J. M., J. R. Newcomb, M. J. Surman, J. A. Barbosa, and P. Cresswell. 1992. HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* 360: 474-477.
24. Denzin, L. K., and P. Cresswell. 1995. HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II $\alpha\beta$ dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 82: 155-165.
25. Matza, D., A. Kerem, and I. Shachar. 2003. Invariant chain, a chain of command. *Trends Immunol* 24: 264-268.
26. Beswick, E. J., and V. E. Reyes. 2009. CD74 in antigen presentation, inflammation, and cancers of the gastrointestinal tract. *World J. Gastroenterol* 15: 2855-2861.
27. Duan, F., and P. K. Srivastava. 2012. An invariant road to cross-presentation. *Nat. Immunol* 13: 207-208.
28. Anderson, M. S., and J. Miller. 1992. Invariant chain can function as a chaperone protein for class II major histocompatibility complex molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2282-2286.
29. Shachar, I., and M. Haran. 2011. The secret second life of an innocent chaperone: the story of CD74 and B cell/chronic lymphocytic leukemia cell survival. *Leuk. Lymphoma* 52: 1446-1454.
30. Leng, L., C. N. Metz, Y. Fang, J. Xu, S. Donnelly, J. Baugh, T. Delohery, Y. Chen, R. A. Mitchell, and R. Bucala. 2003. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J. Exp. Med* 197: 1467-1476.
31. Beswick, E. J., D. A. Bland, G. Suarez, C. A. Barrera, X. Fan, and V. E. Reyes. 2005. *Helicobacter pylori* binds to CD74 on gastric epithelial cells and stimulates interleukin-8 production. *Infect. Immun* 73: 2736-2743.

32. Jasanoff, A., S. Song, A. R. Dinner, G. Wagner, and D. C. Wiley. 1999. One of two unstructured domains of Ii becomes ordered in complexes with MHC class II molecules. *Immunity* 10: 761-768.
33. Roche, P. A., M. S. Marks, and P. Cresswell. 1991. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 354: 392-394.
34. Bijlmakers, M. E., P. Benaroch, and H. L. Ploegh. 1994. Mapping functional regions in the lumenal domain of the class II-associated invariant chain. *J. Exp. Med* 180: 623-629.
35. Newcomb, J. R., C. Carboy-Newcomb, and P. Cresswell. 1996. Trimeric interactions of the invariant chain and its association with major histocompatibility complex class II alpha beta dimers. *J. Biol. Chem* 271: 24249-24256.
36. Marks, M. S., J. S. Blum, and P. Cresswell. 1990. Invariant chain trimers are sequestered in the rough endoplasmic reticulum in the absence of association with HLA class II antigens. *J. Cell Biol* 111: 839-855.
37. Park, S. J., S. Sadegh-Nasseri, and D. C. Wiley. 1995. Invariant chain made in *Escherichia coli* has an exposed N- terminal segment that blocks antigen binding to HLA-DR1 and a trimeric C-terminal segment that binds empty HLA-DR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11289-11293.
38. Jasanoff, A., G. Wagner, and D. C. Wiley. 1998. Structure of a trimeric domain of the MHC class II-associated chaperonin and targeting protein Ii. *EMBO J* 17: 6812-6818.
39. Ashman, J. B., and J. Miller. 1999. A role for the transmembrane domain in the trimerization of the MHC class II-associated invariant chain. *J. Immunol* 163: 2704-2712.
40. Kukol, A., J. Torres, and I. T. Arkin. 2002. A structure for the trimeric MHC class II-associated invariant chain transmembrane domain. *J. Mol. Biol* 320: 1109-1117.
41. Dixon, A. M., B. J. Stanley, E. E. Matthews, J. P. Dawson, and D. M. Engelman. 2006. Invariant chain transmembrane domain trimerization: a step in MHC class II assembly. *Biochemistry* 45: 5228-5234.
42. Motta, A., P. Amodeo, P. Fucile, M. Castiglione Morelli, B. Bremnes, and O. Bakke. 1997. A new triple-stranded α -helical bundel in solution: the assembling of the cytosolic tail of MHC associated invariant chain. *Structure* 5: 1453-1464.
43. Gedde-Dahl, M., I. Freisewinkel, M. Staschewski, K. Schenck, N. Koch, and O. Bakke. 1997. Exon 6 is essential for invariant chain trimerization and induction of large endosomal structures. *J. Biol. Chem* 272: 8281-8287.
44. Arneson, L. S., and J. Miller. 1995. Efficient endosomal localization of major histocompatibility complex class II-invariant chain complexes requires multimerization of the invariant chain targeting sequence. *J. Cell Biol* 129: 1217-1228.
45. Majera, D., K. C. Kristan, J. Neefjes, D. Turk, and M. Mihelic. 2012. Expression, purification and assembly of soluble multimeric MHC class II-invariant chain complexes. *FEBS Lett* 586: 1318-1324.
46. Bertolino, P., M. Staschewski, M.-C. Trescol-Biémont, I. M. Freisewinkel, K. Schenck, I. Chrétien, F. Forquet, D. Gerlier, C. Rabourdin-Combe, and N. Koch. 1995. Deletion of a C-terminal sequence of the class II-associated invariant chain abrogates invariant chains oligomer formation and class II antigen presentation. *J. Immunol* 154: 5620-5629.
47. Amigorena, S., P. Webster, J. Drake, J. Newcomb, P. Cresswell, and I. Mellman. 1995. Invariant chain cleavage and peptide loading in major histocompatibility complex class II vesicles. *J. Exp. Med* 181: 1729-1741.

48. Faubert, A., A. Samaan, and J. Thibodeau. 2002. Functional analysis of tryptophans alpha 62 and beta 120 on HLA-DM. *J. Biol. Chem* 277: 2750-2755.
49. Khalil, H., A. Brunet, I. Saba, R. Terra, R. P. Sekaly, and J. Thibodeau. 2003. The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int. Immunol* 15: 1249-1263.
50. Khalil, H., A. Brunet, and J. Thibodeau. 2005. A three-amino-acid-long HLA-DRbeta cytoplasmic tail is sufficient to overcome ER retention of invariant-chain p35. *J. Cell Sci* 118: 4679-4687.
51. Cloutier, M., C. Gauthier, J. S. Fortin, and J. Thibodeau. 2014. The invariant chain p35 isoform promotes formation of nonameric complexes with MHC II molecules. *Immunol. Cell Biol* 92: 553-556.
52. Cloutier, M., C. Gauthier, J. S. Fortin, L. Geneve, K. Kim, S. Gruenheid, J. Kim, and J. Thibodeau. 2015. ER egress of invariant chain isoform p35 requires direct binding to MHCII molecules and is inhibited by the NleA virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Hum. Immunol* 76: 292-296.
53. Thayer, W. P., L. Ignatowicz, D. A. Weber, and P. E. Jensen. 1999. Class II-associated invariant chain peptide-independent binding of invariant chain to class II MHC molecules. *J. Immunol* 162: 1502-1509.
54. Neumann, J., and N. Koch. 2006. A novel domain on HLA-DRbeta chain regulates the chaperone role of the invariant chain. *J. Cell Sci* 119: 4207-4214.
55. Ghosh, P., M. Amaya, E. Mellins, and D. C. Wiley. 1995. The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 378: 457-462.
56. Thayer, W. P., C. T. Dao, L. Ignatowicz, and P. E. Jensen. 2003. A novel single chain I-A(b) molecule can stimulate and stain antigen-specific T cells. *Mol. Immunol* 39: 861-870.
57. Wraight, C. J., P. Van Endert, P. Moller, J. Lipp, N. R. Ling, I. C. MacLennan, N. Koch, and G. Moldenhauer. 1990. Human major histocompatibility complex class II invariant chain is expressed on the cell surface. *J. Biol. Chem* 265: 5787-5792.
58. Ong, G. L., D. M. Goldenberg, H. J. Hansen, and M. J. Mattes. 1999. Cell surface expression and metabolism of major histocompatibility complex class II invariant chain (CD74) by diverse cell lines. *Immunology* 98: 296-302.
59. Meza-Romero, R., G. Benedek, L. Leng, R. Bucala, and A. A. Vandenbark. 2016. Predicted structure of MIF/CD74 and RTL1000/CD74 complexes. *Metab Brain Dis* 31: 249-255.
60. Lindner, R. 2017. Invariant Chain Complexes and Clusters as Platforms for MIF Signaling. *Cells* 6.
61. Becker-Herman, S., G. Arie, H. Medvedovsky, A. Kerem, and I. Shachar. 2005. CD74 is a member of the regulated intramembrane proteolysis-processed protein family. *Mol. Biol. Cell* 16: 5061-5069.
62. Schneppenheim, J., R. Dressel, S. Huttli, R. Lullmann-Rauch, M. Engelke, K. Dittmann, J. Wienands, E. L. Eskelinen, I. Hermans-Borgmeyer, R. Fluhrer, P. Saftig, and B. Schroder. 2013. The intramembrane protease SPPL2a promotes B cell development and controls endosomal traffic by cleavage of the invariant chain. *J. Exp. Med* 210: 41-58.
63. Gil-Yarom, N., L. Radomir, L. Sever, M. P. Kramer, H. Lewinsky, C. Bornstein, R. Blecher-Gonen, Z. Barnett-Itzhaki, V. Mirkin, G. Friedlander, L. Shvidel, Y. Herishanu,

- E. J. Lolis, S. Becker-Herman, I. Amit, and I. Shachar. 2017. CD74 is a novel transcription regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 562-567.
64. Nijenhuis, M., J. Calafat, K. C. Kuijpers, H. Janssen, M. de Haas, T. W. Nordeng, O. Bakke, and J. J. Neefjes. 1994. Targeting major histocompatibility complex class II molecules to the cell surface by invariant chain allows antigen presentation upon recycling. *Eur. J. Immunol* 24: 873-883.
 65. Arunachalam, B., C. A. Lamb, and P. Cresswell. 1993. Transport properties of free and MHC class II associated oligomers containing different isoforms of human invariant chain. *Int. Immunol* 6: 439-451.
 66. Koch, N., M. Zacharias, A. Konig, S. Temme, J. Neumann, and S. Springer. 2011. Stoichiometry of HLA class II-invariant chain oligomers. *PLoS. ONE* 6: e17257.
 67. Cresswell, P., and P. A. Roche. 2014. Invariant chain-MHC class II complexes: always odd and never invariant. *Immunol Cell Biol* 92: 471-472.
 68. Anderson, K. S., and P. Cresswell. 1994. A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *EMBO J* 13: 675-682.
 69. Romagnoli, P., and R. N. Germain. 1995. Inhibition of invariant chain (Ii)-calnexin interaction results in enhanced degradation of Ii but does not prevent the assembly of $\alpha\beta$ Ii complexes. *J. Exp. Med* 182: 2027-2036.
 70. Miller, J., and R. N. Germain. 1986. Efficient cell surface expression of class II MHC molecules in the absence of associated invariant chain. *J. Exp. Med* 164: 1478-1489.
 71. Bikoff, E. K., R. N. Germain, and E. J. Robertson. 1995. Allelic differences affecting invariant chain dependency of MHC class II subunit assembly. *Immunity* 2: 301-310.
 72. Machamer, C. E., and P. Cresswell. 1982. Biosynthesis and glycosylation of the invariant chain associated with HLA-DR antigens. *J. Immunol* 129: 2564-2569.
 73. Romagnoli, P., and R. N. Germain. 1994. The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy. *J. Exp. Med* 180: 1107-1113.
 74. Yamashita, Y., M. Anczurowski, M. Nakatsugawa, M. Tanaka, Y. Kagoya, A. Sinha, K. Chamoto, T. Ochi, T. Guo, K. Saso, M. O. Butler, M. D. Minden, T. Kislinger, and N. Hirano. 2017. HLA-DP(84Gly) constitutively presents endogenous peptides generated by the class I antigen processing pathway. *Nat Commun* 8: 15244.
 75. Anczurowski, M., and N. Hirano. 2018. Mechanisms of HLA-DP Antigen Processing and Presentation Revisited. *Trends Immunol* 39: 960-964.
 76. Kang, S. J., and P. Cresswell. 2002. Regulation of intracellular trafficking of human CD1d by association with MHC class II molecules. *EMBO J* 21: 1650-1660.
 77. Zwart, W., V. Peperzak, V. E. de, A. M. Keller, G. van der Horst, E. A. Veraar, U. Geumann, H. Janssen, L. Janssen, S. H. Naik, J. Neefjes, and J. Borst. 2010. The invariant chain transports TNF family member CD70 to MHC class II compartments in dendritic cells. *J. Cell Sci* 123: 3817-3827.
 78. Schroder, B. 2016. The multifaceted roles of the invariant chain CD74--More than just a chaperone. *Biochim Biophys Acta* 1863: 1269-1281.

Abbreviations

α SCD, alpha single chain dimer; β COP, protein complex coatmer beta subunit; β SCD, beta single chain dimer; DSP, dithiobis (succinimidyl propionate); ER, endoplasmic reticulum; HEK, human embryonic kidney cells; HEL, hen egg-white lysozyme Ag; hIi, human Ii; ICD, intracellular domain; Ii, invariant chain; IP, immunoprecipitation; MFI, mean fluorescence intensity; MHCI, MHC class I; MHCII, MHC class II; MIF, macrophage inhibiting factor; NMR, nuclear magnetic resonance; PCR, polymerase chain reaction; PKC, protein kinase C; TM, transmembrane domain; TRIM, trimerization domain; WB, Western blot; WT, wild type.

Legends and Figures

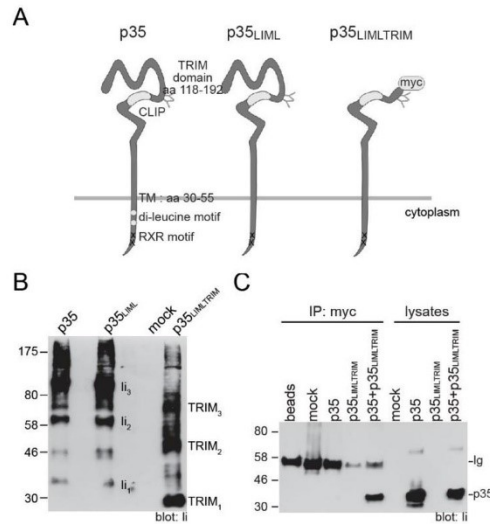


Figure 1: Formation of Ii trimers in absence of the TRIM domain. A, Schematic representation of WT p35, p35^{LIML} and p35^{LIMLTRIM}. Di-leucine endosomal targeting motifs (white dots in p35) were mutated to alanines in p35^{LIML} and p35^{LIMLTRIM}. α -helices responsible for the C-terminal trimerization were deleted (Δ aa128 to 216 of p33) in the p35^{LIMLTRIM} mutant. Loss of the BU45 mAb epitope is coped with by addition of a myc/His-tag (detection 9e10 mAb). B, HEK293T cells were transiently transfected with mock plasmid, p35, p35^{LIML} or p35^{LIMLTRIM}. Cells were lysed in presence of reducible cross-linker DSP (400 μ g/ml). Proteins were separated by SDS-PAGE in non-reducing conditions. Samples were blotted using a rabbit anti-CLIP serum. Monomeric (Ii₁, TRIM₁), dimeric (Ii₂, TRIM₂) and trimeric (Ii₃, TRIM₃) forms are indicated on the right. C, HEK293T cells were transiently transfected with mock plasmid, p35, p35^{LIMLTRIM} or p35 and p35^{LIMLTRIM}. Cells were lysed and immunoprecipitated using 9e10 mAb. Immunoprecipitated material and cells lysates were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotted for WT p35 using Pin.1.

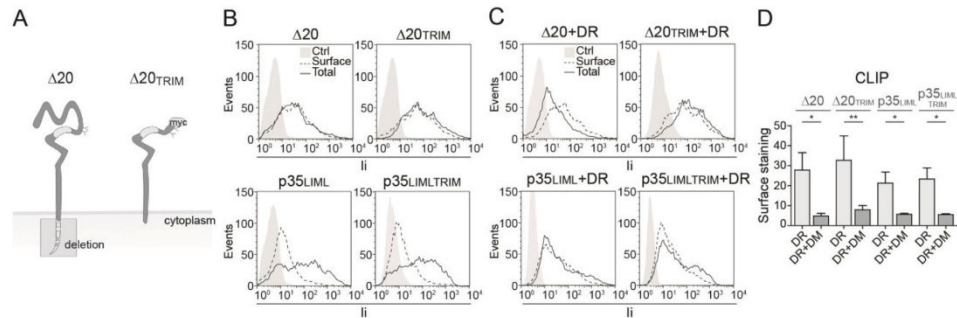


Figure 2: The Ii C-terminal TRIM domain is not necessary for binding to MHCII molecules and to egress the ER. A, Schematic representation of $\Delta 20$ and $\Delta 20_{\text{TRIM}}$. Di-leucine endosomal targeting motifs were removed by the deletion (gray box) of the first N-terminal cytoplasmic 20 aa of p33 in $\Delta 20$ and $\Delta 20_{\text{TRIM}}$ mutants. As for $p35_{\text{LIMLTRIM}}$, the TRIM domain was deleted (Δ aa128 to 216 of p33) in the $\Delta 20_{\text{TRIM}}$ mutant and a myc/His-tag was added (detection 9e10 mAb). B, Ii $\Delta 20$, $\Delta 20_{\text{TRIM}}$, $p35_{\text{LIML}}$ or $p35_{\text{LIMLTRIM}}$ were transiently transfected in HEK293T cells. After 48h, cells were stained to detect surface (black dotted line) and total (black line) Ii using mAbs BU45 or 9e10 (for Ii_{TRIM} mutants). C, Cells were transfected as above together with DR and stained for surface and total Ii. D, Cells from (C) and cells transfected as in (C) together with DM were stained for surface CLIP using CerCLIP.1 Ab. CLIP MFIs (mean fluorescence intensity) are expressed in a bar-chart. Error bars indicate the SD from at least five independent experiments. Student t-tests were performed; *: $p \leq 0.001$ and **: $p \leq 0.05$.

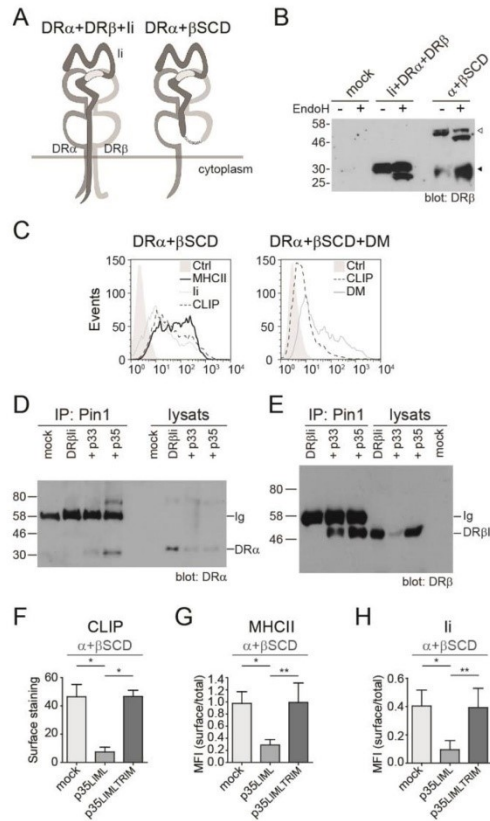


Figure 3: Trimerization through the TRIM domain is sufficient for the formation of high-order complexes. *A*, Schematic representation of WT DRα, DRβ and Ii and DRα and βSCD. In βSCD, Ii and DRβ luminal domains are linked by a flexible gly₃/ser/gly₃ linker. *B*, HEK293T cells were mock transfected or transfected with WT DRα, DRβ and Ii or with DRα and βSCD. Cell lysates, with or without EndoH, were analysed by SDS-PAGE and blotted for DRβ using the XD5 mAb. The open arrow head and arrow represent βSCD and a cleavage product of βSCD, respectively, both of which are resistant to EndoH. *C*, DRα and βSCD were transiently transfected in HEK293T cells. After 48h, cells were stained to detect MHCII, Ii and CLIP using

L243, BU45 and CerCLIP.1 mAbs, respectively (left histogram). Cells were transfected as above as well as with DM and stained for surface CLIP or permeabilized to detect DM, using Map.DM1 mAb (right histogram). *D*, Cells were either mock-transfected with empty pCDNA3.1, transfected with DR α + β SCD alone or together with p33 or p35. Cell lysates (right lanes) and material precipitated with the Ii-specific Pin.1 mAb (left lanes) were analyzed by WB. The DR α chain was detected using the DA6.147 mAb. H chains of Ig used for IPs are indicated. *E*, Samples from (*D*) were analyzed using the XD5.117 mAb specific for the DR β 1 extracellular domain. *F*, *G* and *H*, Cells were transfected with DR α and β SCD alone or together with p35_{LIML} or p35_{LIMLTRIM}. (*F*) MFI obtained for CLIP at the cell surface using CerCLIP.1 are represented in bar charts. (*G*, *H*) MFI ratios obtained for surface expression versus total expression of MHCII (using L243) and Ii (using BU45) are represented in bar charts. Error bars indicate the SD from five independent experiments. Student t-tests were performed; *: $p \leq 0.001$ and **: $p \leq 0.05$.

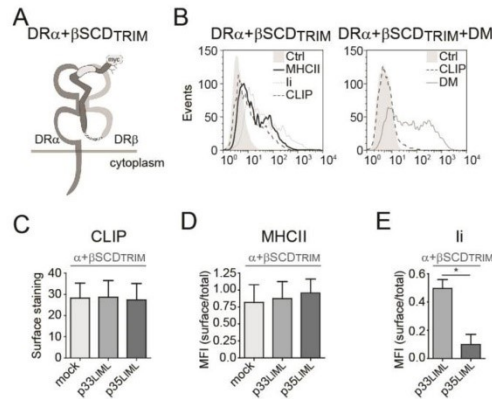


Figure 4: Lack of bidirectional TRIM interactions prevents formation pseudo-heptamers and/or pseudo-pentamers including β SCD. A, Schematic representation of DR α and β SCD_{TRIM}. B, DR α and β SCD_{TRIM} were transiently transfected in HEK293T cells (left histogram). After 48h, cells were stained to detect MHCII, Ii and CLIP using L243, 9e10 and CerCLIP.1 mAbs, respectively. Cells were transfected as above, as well as with DM and stained for surface CLIP. A fraction of the cells was permeabilized to detect DM using Map.DM1 mAb (right histogram). (C, D and E) Cells were transfected with DR α and β SCD_{TRIM} alone or together with p35_{LIML} or p35_{LIML}_{TRIM}. After 48h, cells were stained to detect surface CLIP (CerCLIP.1) (C). The surface over total expression ratio of MHCII (L243) (D) and Ii (BU45) (E) were calculated. Error bars indicate the SD from five independent experiments. Student t-tests were performed; *: p \leq 0.001.

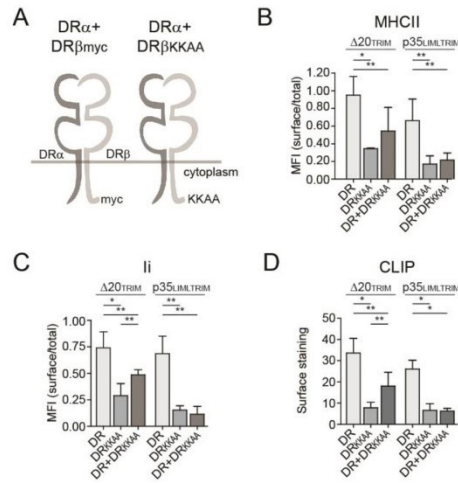


Figure 5: The TM domain supports formation of nonameric complexes in the absence of TRIM. A, Schematic representation of DRα, DRβ_{myc} and DRβ_{KKAA}. (B, C and D) HEK293T cells were transiently transfected with DRα and DRβ_{myc} (DR) and/or DRα+DRβ_{KKAA} (DR_{KKAA}) together $\Delta 20_{TRIM}$ or $p35_{LIMLTRIM}$. After 48h, cells were analyzed by flow cytometry to evaluate surface to total expression ratio of MHCII (B), and Ii (C) using L243 and BU45 respectively and CLIP surface expression using Cer-CLIP.1 (D). Error bars indicate the SD from at least three independent experiments. Student t-tests were performed; *: $p \leq 0.001$ and **: $p \leq 0.05$.

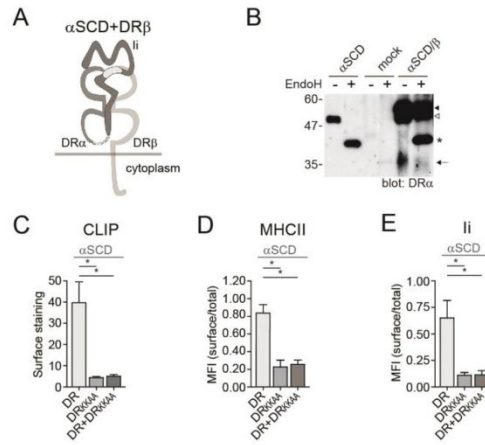


Figure 6: DR is retained by DR_{KKAA} upon formation of nonameric-like structure. *A*, Schematic representation of αSCD and DRβ. DRα and Ii luminal domains are linked by a flexible gly₃/ser/gly₃ linker (αSCD). *B*, HEK293T cells were mock transfected or transfected with αSCD or with αSCD and DRβ. Cell lysates were treated with or without EndoH and blotted for DRα (DA6.147). Open arrow head and arrow head represent αSCD EndoH resistant degraded and non-degraded, respectively. Star represents αSCD EndoH sensitive. Arrow represent cleavage products of αSCD. (*C*, *D* and *E*) HEK293T cells were transiently transfected with DRβ_{myc} (DR) and/or DRβ_{KKAA} together with αSCD. After 48h, cells were analyzed by flow cytometry to evaluate CLIP surface expression, using CerCLIP.1 (*C*), MHCII (*D*) and Ii (*E*) surface over total expression ratio using L243 and BU45 respectively. Error bars indicate the SD from at least three independent experiments. Student t-tests were performed; *: $p \leq 0.001$ and **: $p \leq 0.05$.

CHAPITRE 3 : DISCUSSION

1 L'isoforme p35 de la chaîne invariante favorise la formation de complexes nonamériques avec les molécules de classe II

Dans cette section de la discussion, nous allons aborder en premier lieu la controverse sur la formation des pentamères et nonamères dans laquelle s'est inscrite nos travaux. Nous présenterons certaines expériences préliminaires effectuées dans le laboratoire qui nous ont laissé entrevoir l'importance de p35 dans la formation des complexes nonamériques. Nous discuterons de l'implication des différentes stœchiométries, soit de l'implication de la formation des pentamères et des nonamères. Finalement nous aborderons l'importance des ratios p33:p35 dans la stœchiométrie des complexes formés.

1.1. La controverse : être ou ne pas être un nonamère

Il y a plus de 20 ans, le groupe de recherche de Peter Cresswell à l'Université Yale a montré l'existence des complexes nonamériques $(\alpha\beta\text{li})_3$. Ces complexes sont formés d'un trimère de la chaîne invariante et de trois dimères $\alpha\beta$ de CMHII (Roche et al., 1991a; Lamb et Cresswell, 1992). Selon ces travaux, les molécules de classe II sortent du RE de sous la forme de complexe $(\alpha\beta\text{li})_3$ (Roche et al., 1991a; Lamb et Cresswell, 1992). Plus récemment, une étude contradictoire du groupe de Springer suggère que les trimères de la chaîne invariante s'associent à un dimère $\alpha\beta$ formant des pentamères $\alpha\beta\text{li}_3$ qui sont en mesure de

quitter le RE (Koch et al., 2011). Ce groupe de recherche critique ouvertement l'utilisation de la méthode de réticulation chimique (ou « crosslinking ») par le groupe de Cresswell. En effet, en augmentant graduellement, dans des lysats de Raji, la concentration de DSP (3,3'- dithiobis succinimidyl propionate), un agent chimique permettant la réticulation, Koch *et al*, ont observé l'apparition de complexes à haut poids moléculaire incluant la chaîne invariante (Koch et al., 2011). Ils argumentent que ces complexes sont composés de pentamères li-CMHII associés à d'autres protéines (Koch et al., 2011). Selon eux, l'utilisation de DSP stabiliserait des interactions peu stables et transitoires entre la chaîne invariante et autres protéines, ce qui aurait permis une identification erronée de complexes li-CMHII à haut poids moléculaire par le groupe de Cresswell (Koch et al., 2011). Or, dans les travaux initiaux de Roche *et al*, des complexes li-CMHII marqués à la méthionine S^{35} et purifiés à partir de lysats de cellules B humaines (B-LCL Swei) sont soumis à des concentrations croissantes de DSP et analysés par SDS-PAGE (Roche et al., 1991a). Ils estiment à 260kDa le poids des complexes li-CMHII (Roche et al., 1991a). Ces mêmes échantillons, migrés sur un gel réducteur, donnent lieu à des bandes correspondant aux poids moléculaires des chaînes α , β et la chaîne invariante, et identiques aux bandes observées pour des échantillons dépourvus de DSP (Roche et al., 1991a). C'est donc dans le contexte de cette controverse sur la formation de pentamères versus nonamères que s'inscrivent nos travaux sur le ciblage de la chaîne invariante.

1.2 Historique du trafic li-CMHII

D'après de nombreux travaux, l'efficacité du trafic des CMHII est influencée par l'abondance relative des différentes isoformes de la chaîne invariante (Lotteau et al., 1990; Arunachalam et al., 1993; Saudrais et al., 1998; Yan et al., 2003). Alors que le motif de rétention au RE de l'isoforme p35 retarde la sortie des complexes li-CMHII de cette organelle, les isoformes p41 et p43 freinent la dégradation de la chaîne invariante dans les endosomes et ce faisant, ralentissent le chargement de peptides antigènes sur les CMHII. De manière générale, il est convenu que le trafic intracellulaire des CMHII est plus rapide lorsqu'exprimées seules que lorsqu'elles sont exprimées en présence de l'isoforme p33, et est ralenti d'avantage en présence de l'isoforme p35 (Yan et al., 2003; Sand et al., 2014).

Lors de travaux préliminaires dans le cadre de nos recherches sur l'isoforme p35, nous avons tenté d'observer une telle différence entre le trafic de l'isoforme p33 et le trafic de l'isoforme p35 par une simple analyse de cytométrie en flux (annexe 1 - figure 1A et B). Nous avons observé que, tandis que p33 accède à la surface cellulaire dans des conditions où les niveaux d'expression de DR faibles, p35 requiert une concentration de DR supérieure pour atteindre la surface. Bien que ces résultats ne dévoilent en aucun cas la stœchiométrie des complexes li-CMHII, ils pointent vers une disparité dans le comportement des isoformes p33 et p35, tel que suggéré par les travaux antérieurs. A posteriori, il est aisé d'imaginer que ces différences coïncident avec la formation de pentamères et nonamères pour p33 et p35, respectivement. La formation de nonamères autour de p35 expliquerait la nécessité

d'une grande concentration de DR, dans quel cas les trimères de p35 associés à un ou deux dimères de CMHII seraient retenus dans le RE jusqu'à l'association d'un troisième dimère.

En parallèle, nous avons effectué des gradients de sucrose, tels que décrits par Koch *et al*, afin de comparer le poids moléculaire des complexes formés autour des trimères p33 ou p35 (annexe 1 - figure 1C) (Koch et al., 2011). Nous avons ainsi observé la formation de complexes li-CMHII possédant un poids moléculaire plus élevé autour de l'isoforme p35 que de l'isoforme p33.

Les résultats que nous avons obtenus pour l'isoforme p33 rappellent les résultats obtenus par le groupe de Koch *et al*, qui proposent la formation de pentamères (annexe 1 - figure 1C)(Koch et al., 2011). Lors de ces travaux, les auteurs utilisent majoritairement deux types cellulaires humains, les Raji et MelJuso (Koch et al., 2011). Bien que ces deux lignées cellulaires soient normalement en mesure de produire à la fois les isoformes p33 et p35, les immunobuvardages effectués contre la chaîne invariante dans cet article montrent de très faibles quantités de p35. L'observation de formation de pentamères associée à la quasi-absence de p35 dans les expériences de Koch *et al*, s'apparente à l'absence de complexe à haut poids moléculaire que nous observons dans nos gradients de sucrose de p33-DR. Par ailleurs, l'identification initiale de complexes nonamériques par le groupe de Cresswell a été effectuée dans des cellules B-LCL Swei, qui expriment une quantité considérable de l'isoforme p35 (Roche et al., 1991a). Or, leurs résultats se comparent à ce que nous observons pour nos gradients de sucrose des complexes DR-p35 (annexe 1 - figure 1C). Ces

résultats non-publiés suggèrent l'existence de complexes à poids moléculaire plus élevé autour de p35 qu'autour de p33. À la lumière de ces résultats, il semblerait que des complexes pentamériques et nonamériques se forment autour des isoformes p33 et p35, respectivement.

1.3 L'isoforme p35 de la chaîne invariante promeut la formation de complexes nonamériques avec les molécules de CMHII

Nous avons effectué nos travaux dans l'optique d'éclaircir la stœchiométrie des complexes li-CMHII, tout en approfondissant notre étude sur le trafic de l'isoforme p35 entreprise antérieurement dans le laboratoire (Khalil et al., 2003; Khalil et al., 2005). Afin de compléter les résultats obtenus préalablement par les différents groupes de recherche, nous avons revisité la question de la stœchiométrie des complexes à l'aide d'une approche novatrice. Dans le premier article (Chapitre 2 : Résultats, Section 1), nous utilisons un essai fonctionnel qui repose sur l'utilisation d'un mutant de DR retenu au RE, soit le mutant DR_{KKAA} (Cloutier et al., 2014). Nous démontrons à l'aide de cet essai fonctionnel que l'isoforme p35 force la formation de nonamères alors que l'isoforme p33 conduit à la formation de pentamères (article 1, figure 1 et figure 14) (Cloutier et al., 2014). En utilisant cette même stratégie, nous observons en outre l'incorporation de différents isotypes des CMHII dans un même complexe formé autour du trimère de l'isoforme p35 (article 1, figure

2). Nous allons discuter de l'implication de ces différentes stœchiométries dans les sections suivante.

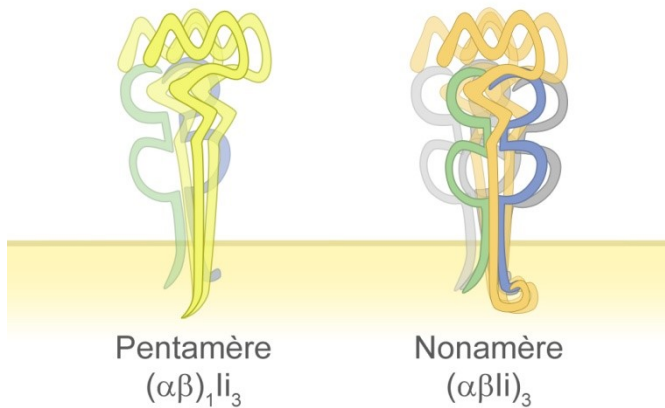


Figure 14: Formation de complexes li-CMHII autour des isoformes p33 et p35.

À gauche, les pentamères $(\alpha\beta)_1li_3$ formés autour de l'isoforme p33 (jaune) quittent le RE. À droite, on observe la formation de nonamères $(\alpha\beta li)_3$ autour de l'isoforme p35 (orange) capables de transport antérograde.

1.4 Implications d'une stœchiométrie variable

Deux papiers parus en 1999 et 2012 adressent, *in vitro* et *in vivo*, la formation de complexes li-CMHII de différentes stœchiométries, soit des pentamères $\alpha\beta(li)_3$, des heptamères $(\alpha\beta)_2(li)_3$ et des nonamères $(\alpha\beta li)_3$, autour de mutants de la chaîne invariante dépourvus de leur queues cytoplasmiques et de leur domaines transmembranaires (Jasanoff et al., 1999; Majera et al., 2012). Jasanoff *et al*, ont observé que le nombre de complexes nonamériques formés *in vitro* augmente proportionnellement à l'augmentation du ratio de li/CMHII. Ces résultats sous-entendent que la liaison coopérative des CMHII à la chaîne invariante n'existe pas pour des sous-unités solubles *in vitro* (Jasanoff et al., 1999).

Le modèle de la formation de complexes pentamériques proposé par Koch *et al*, repose sur l'hypothèse que l'association d'un dimère $\alpha\beta$ à un trimère de la chaîne invariante

courbe le trimère vers la membrane, empêchant ainsi la liaison de dimères supplémentaires à celui-ci (Koch et al., 2011). Selon cette hypothèse, le domaine transmembranaire de la chaîne invariante contribuerait à éloigner les sites de liaisons additionnels de la membrane et jouerait un rôle dans la formation de pentamères. Étant donné que les observations de complexes à stœchiométries variables faites par les groupes de Majera *et al*, et Jasanoff *et al*, sont effectuées à l'aide de mutants dépourvus de domaines transmembranaires, il est impossible selon leurs travaux d'affirmer ou d'infirmer l'hypothèse mise de l'avant par Koch *et al*, sur la formation de pentamères. Ainsi, notre stratégie reposant sur les mutants KKXX de DR nous a permis d'évaluer de façon fonctionnelle l'existence des nonamères en présence du domaine transmembranaire de la chaîne invariante et des CMHII. Grâce à cette stratégie, nous avons déduit dans un premier temps la formation de pentamères autour de l'isoforme p33 dont nous discuterons dans la section 1.4.1 de la discussion. Dans un deuxième temps, nous avons mis en évidence la formation de complexes nonamériques autour des trimères de p35. Ces complexes seront discutés dans la section 1.4.2. Par le fait même, nous avons ainsi infirmé l'hypothèse de Koch *et al*, selon laquelle le domaine transmembranaire représente une contrainte lors de la formation d'un nonamère.

1.4.1 Implication fonctionnelle de la formation des pentamères

Dans les CPA, la chaîne invariante est généralement exprimée en large excès par rapport aux CMHII (Machamer et Cresswell, 1982). De ce fait, la sortie de complexes li-CMHII du RE sous la forme de pentamères (ou heptamères) serait favorisée.

Tel qu'évoqué plus haut, l'efficacité du trafic des CMHII est influencée par la concentration des différentes isoformes de la chaîne invariante; le trafic des CMHII est plus efficace en présence p33 que de p35 (Lotteau et al., 1990; Arunachalam et al., 1993; Saudrais et al., 1998; Yan et al., 2003). Sachant que des pentamères sont formés autour de trimères de p33 et que des nonamères sont formés autour de trimères de p35, on peut certainement allouer la différence de rapidité du transport des complexes li-CMHII pour les différentes isoformes de la chaîne invariante à la formation de complexes plus ou moins volumineux. Ainsi la formation de pentamères autour de p33 pourrait vraisemblablement résulter en un transport plus rapide des complexes li-CMHII.

Une conséquence directe de la formation des nonamères est l'existence de complexes comprenant différents isotypes (DR, DP et/ou DQ) liés à un même trimère de chaîne invariante. Inversement, la formation exclusive de pentamères suggérée par Koch *et al*, mènerait à l'impossibilité d'observer la présence de tels complexes mixtes. Un papier paru en 1978 démontre, chez la souris, une co-isolation des isotypes H-2A et H-2E de façon exclusive avec la chaîne invariante, et l'absence de co-isolation de H-2A et H-2E (Jones et

al., 1978). Nous avons effectué des observations similaires pour p33 lorsque mis en présence de DR_{KKAA} et DQ, où DQ et DR font partie de complexes distincts (article 1, figure 2). Selon les résultats de Jones *et al*, ainsi que nos propres résultats, et considérant l'absence des isoformes p35 et p43 chez la souris, on peut croire à la formation exclusive de pentamères chez cet animal. Ceci semble soutenu par l'absence d'observation de nonamères chez la souris alors qu'il existe de nombreuses observations de complexes nonamériques chez l'humain (Roche et al., 1991a; Anderson et Cresswell, 1994; Newcomb et al., 1996).

Le groupe de recherche d'Hirano a récemment démontré qu'un HLA-DP, tel que DP4, ne liant pas la région CLIP forme exclusivement des complexes pentamériques avec des trimères de Ii (Yamashita et al., 2017). Il sera intéressant de tester si la stœchiométrie des complexes Ii-HLA-DP4 influence la prévalence de maladies auto-immunitaires associées à ce DP (Anczurowski et Hirano, 2018).

Par conséquent, on peut s'interroger sur la fonction réelle de la trimérisation de la chaîne invariante chez la souris dans le contexte où il n'y aurait que des pentamères $\alpha\beta Ii_3$. Dans un premier temps, des travaux d'Anderson *et al*, démontrent que la trimérisation de la chaîne invariante est nécessaire à un ciblage efficace du motif LIML aux endosomes (Arneson et Miller, 1995). Ainsi l'existence de complexes trimériques $\alpha\beta Ii$, au lieu de pentamères $\alpha\beta Ii_3$, aurait pour effet de réduire la vitesse d'internalisation des CMHII vers les compartiments endosomaux (Arneson et Miller, 1995). Suivant la même logique, il a été démontré que la trimérisation de la chaîne invariante joue un rôle important dans la

formation de grandes structures vacuolaires associées à la présentation de classe II (Gedde-Dahl et al., 1997; Nordeng et al., 2002). De plus, la formation de trimères de la chaîne invariante permet l'insertion de différentes isoformes au sein d'un même complexe qui a pour effet de moduler le trafic des CMHII. Par exemple, chez la souris, l'insertion d'un ou plusieurs isoformes p41 au trimère a comme effet de ralentir la dégradation des chaînes invariantes associées (Fineschi et al., 1995). En plus de ralentir la dégradation de la chaîne invariante, l'isoforme p41 est associée à la production de CMHII solubles relâchées dans le sérum qui seraient associées à la tolérance au soi (Shishido et al., 2019).

Finalement, il est proposé que seule la forme trimérique de CD74 est capable d'agir comme récepteur de MIF, lui-même un trimère, à la surface cellulaire (Leng et Bucala, 2006; Meza-Romero et al., 2016). Ainsi, bien qu'à première vue, les complexes $\alpha\beta\text{Ii}$ semblent équivalant aux complexes pentamériques $\alpha\beta\text{Ii}_3$ à ce qui attire au trafic des molécules de classe II, il semble que la trimérisation de la chaîne invariante prodigue à la chaîne invariante et aux complexes des propriétés additionnelles.

1.4.2 Implication de la formation des nonamères

L'observation de complexes nonamériques suggère l'existence d'un mécanisme favorisant leur formation. Il existe au moins trois scénarios pouvant expliquer la formation de ces complexes dans le RE. Le premier propose que seuls les complexes nonamériques sont considérés comme correctement assemblés et capables de sortir du RE. Cependant, comme la formation de complexes pentamériques autour de l'isoforme p33 permet aussi

la sortie du RE, nous pouvons en déduire que la stœchiométrie n'influe pas les mécanismes de ciblage à partir du RE.

Le second suggère la présence d'une liaison coopérative facilitant l'association de CMHII additionnelles aux trimères de la chaîne invariante. Toutefois, Jasanoff *et al*, démontrent que la formation des nonamères dépend du ratio li/CMHII, suggérant ainsi l'absence d'un tel type de liaison entre la chaîne invariante et les CMHII (Jasanoff et al., 1999).

Finalement, le troisième scénario suggère la présence d'un motif permettant de retenir les complexes li-CMHII dans le RE jusqu'à ce que chaque chaîne invariante dans le trimère soit associée à une molécule de classe II. Ainsi, l'étude du rôle du motif di-arginine dans la formation de nonamères autour de p35 a fait l'objet de notre second article et sera approfondi dans la section 2 de la discussion (Cloutier et al., 2015).

La formation de nonamères pourrait expliquer l'observation d'un transport li-CMHII plus lent en présence de p35 étant donné l'incorporation trois CMHII au trimère de p35 (Yan et al., 2003). Un ralentissement du trafic des complexes li-CMHII par une surexpression de p35 pourrait réduire la disponibilité de CMHII dans les endosomes et leur chargement par un peptide antigène de façon à favoriser l'évasion au système immunitaire, comme observé dans les CLL (Veenstra et al., 1993, 1996).

Neumann et Koch suggèrent que l'important excès de la chaîne invariante exprimé par les CPAs favorise la formation de complexes α -li₃ auxquels viendrait se lier les chaînes β plutôt que la formation d'hétérodimères $\alpha\beta$ qui se lient les trimères de la chaîne

invariante. Dans le contexte de la formation de nonamères, ceci impliquerait que différentes chaînes α lieraient à tour de rôle le trimère de p35 auquel viendraient graduellement s'ajouter les chaînes β correspondantes. Inversement, dans le cas de la formation de pentamères, ce modèle suggère que l'association d'une chaîne β complémentaire à la chaîne α d'un complexe α -I i_3 s'effectue avant l'association d'une nouvelle chaîne α au complexe α -I i_3 . Bien qu'il semble évident que la chaîne α soit capable de lier la chaîne invariante directement (Neumann et Koch, 2005; Meza-Romero et al., 2014), ce modèle présenté en 2005 par Neumann et Koch devrait être revisité dans le contexte de la démonstration de l'existence de complexes pentamériques et nonamériques.

Comme mentionné plus haut, la formation de nonamères implique la possibilité d'observer différents isotypes de CMHII au sein d'un même complexe I i -CMHII. Les premières observations de la présence de différents isotypes au sein d'un même complexe I i -CMHII remontent au début des années 80' (De Kretser et al., 1982). Dix années plus tard, le groupe de Cresswell a observé, dans des cellules humaines B-LCL transfectées avec un CMHII de souris, I-A^k, la présence de CMHII humaines et murines autour d'un même trimère de la chaîne invariante (Riberdy et Cresswell, 1992). Lors de nos travaux, nous avons obtenu des résultats similaires où des molécules de classe II HLA-DR et HLA-DQ sont associées autour d'un même trimère de p35 (article 1, figure. 2) (Cloutier et al., 2014). L'avantage de la formation d'un nonamère possédant différents isotypes des CMHII reste à déterminer.

1.4.3 L'importance du ratio des isoformes p33 et p35

La situation physiologique ne se résume pas à la formation exclusive de complexes li-CMHII sous forme de pentamères ou de nonamères. Typiquement, les isoformes p33 et p35 représentent respectivement 80% et 20% de la chaîne invariante synthétisée bien que ces niveaux puissent varier d'un type cellulaire à l'autre (Veenstra et al., 1993; Anderson et al., 1999; Yan et al., 2003). Ce ratio d'expression 80:20 des isoformes p33:p35 agit sur la composition des trimères et résulte en 51% d'homotrimères p33, 1% homotrimères p35 et 48% d'hétérotrimères p33/p35 (Anderson et al., 1999).

Ainsi, dans des cellules exprimant à la fois les isoformes p33 et p35, la formation de complexes li-CMHII autour de trimères de la chaîne invariante se traduira par la formation de complexes pentamériques, heptamériques ou nonamériques ; la stœchiométrie étant dictée par le ratio p33/p35.

On peut donc penser qu'une augmentation de l'expression de p35 aurait pour conséquence d'augmenter le réservoir de chaîne invariante résident dans le RE en attente de lier une molécule de classe II. En effet, selon des observations effectuées dans des cellules B transfectées, l'isoforme p33 réside moins de 3h dans le RE alors que p35 y réside entre 6h et 9h (Arunachalam et al., 1993). L'augmentation du nombre de chaînes invariantes disponibles dans le RE aurait possiblement pour effet de diminuer la sortie de CMHII libres et favoriser l'association de dimères CMHII ayant une faible affinité pour la chaîne (figure 15).

Un effet du niveau d'expression de p35 a été observé sur la prévalence du diabète auto-immun (Yan et al., 2003). En effet, on observe dans les cellules B dérivées de patients diabétique une expression de p35 de 30 à 60% inférieure à celle observée dans les cellules B de frères jumeaux non-diabétiques correspondants (Yan et al., 2003). Ainsi, une plus forte expression de p35 semble conférer une protection quand au développement du diabète auto-immun. Bien que les avantages et désavantages à la formation de complexes nonamériques restent à être élucidés, il semble évident que le niveau d'expression de l'isoforme p35 influence la présentation antigénique de classe II (figure 15) (Veenstra et al., 1993; Yan et al., 2003).

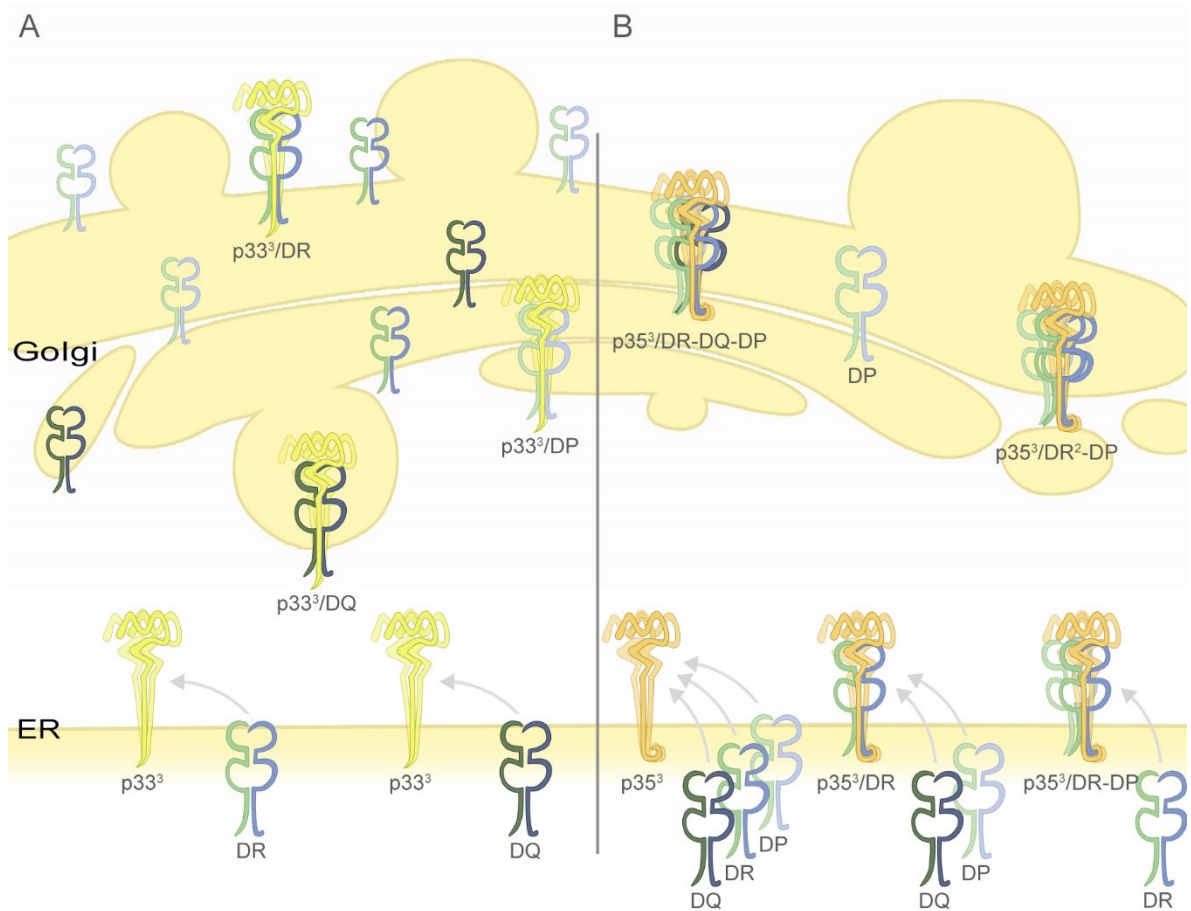


Figure 15: Transport modélisé des complexes p33-CMHII et p35-CMHII en présence des différents isotypes HLA-DR, DP et DQ.

(A) Transport de DR, DP et DQ en présence p33. La formation de pentamères autour de l'isoforme p33 permet à un seul CMHII de s'associer au trimère. Dans ce contexte, différents isotypes des CMHII ne s'associent pas au même trimère de la chaîne invariante. La formation de ce complexe pentamérique résulte en une sortie du RE plus rapide et peut avoir pour effet le réservoir de chaîne invariante disponible de manière à observer la sortie du RE de CMHII libres. **(B)** Transport de DR, DP et DQ en présence de p35. Inversement, en présence de p35, il y a formation de nonamères où différents isotypes peuvent être incorporés dans un même complexe. La formation de nonamères augmente la disponibilité de la chaîne invariante dans le RE tout en réduisant la vitesse de sortie de ces complexes.

2 La sortie du RE de l'isoforme p35 de la chaîne invariante

requiert une liaison directe avec les molécules du CMHII

2.1 Masquage du motif de rétention de l'isoforme p35

2.1.1 Ce que nous savons et ce qu'il nous reste à éclaircir

Le masquage du motif di-arginine de l'isoforme p35 de la chaîne invariante a fait l'objet de plusieurs études par différents groupes de recherche (Lotteau et al., 1990; Marks et al., 1990; Schutze et al., 1994; Kuwana et al., 1998; O'Kelly et al., 2002; Khalil et al., 2003; Khalil et al., 2005). À ce jour, le mécanisme de masquage du motif RXR de p35 repose sur deux modèles, l'implication respective desquels est toujours mal comprise. Le premier mécanisme repose sur l'expression des CMHII. Selon celui-ci l'expression des CMHII est requise à la sortie de trimères de la chaîne invariante possédant au moins une copie de l'isoforme p35. En absence de CMHII, ces trimères sont retenus au RE (Marks et al., 1990). D'après des travaux effectués dans notre laboratoire, la queue cytoplasmique de la chaîne β des CMHII masque le motif RXR et permet le transport antérograde des complexes p35-CMHII (Khalil et al., 2003; Khalil et al., 2005). La nature et le mécanisme de ce « masquage » demeurent élusifs. Le second mécanisme suppose que la phosphorylation de la sérine 8 de l'isoforme p35 permet la liaison de 14-3-3, ce qui empêche la liaison de β COP, et permet le transport antérograde de la chaîne invariante (Kuwana et al., 1998; O'Kelly et al., 2002). Par conséquent, bien qu'il soit admis que la sortie de l'isoforme p35 requiert à la fois, - la phosphorylation de la queue cytoplasmique de p35, - l'interaction de 14-3-3 à la queue de

p35 ainsi que - l'intervention de la queue cytoplasmique de la chaîne β des CMHII, le mécanisme et la séquence selon lesquels ces trois événements se produisent restent incertains.

Les travaux de Koch *et al*, suggèrent que les nonamères représentent des artéfacts expérimentaux et que des contraintes structurelles seraient responsables de la formation exclusive de pentamères (Koch et al., 2011). L'absence d'heptamères et de nonamères implique donc qu'une seule queue cytoplasmique de DR β est capable de masquer le motif de rétention des différentes isoformes p35 présents au sein d'un même pentamère. Au demeurant, ceci signifie que les queues cytoplasmiques seraient en mesure de masquer ces motifs de rétention par une liaison indirecte (en trans). Or, nous avons démontré que le masquage du motif RXR de p35 requiert une interaction directe avec la queue cytoplasmique de DR β , forçant ainsi la formation de nonamères autour de trimères de cette isoforme (Cloutier et al., 2015).

La nécessité de la formation de complexe nonamérique autour d'un trimère de p35 suggère que cette isoforme de la chaîne invariante ne peut accéder à la surface en absence de CMHII. Or, deux articles parus en 2013 et 2014 ont démontré que des mutants correspondants aux domaines $\alpha 1\beta 1$ des CMHII inhibent la liaison de MIF à la chaîne invariante (Benedek et al., 2013; Meza-Romero et al., 2014). De plus, ces auteurs suggèrent que la forme trimérique de la chaîne invariante est essentielle à la liaison de MIF (Meza-Romero et al., 2016). Des travaux additionnels seront donc requis afin de déterminer si MIF lie des pentamères ou heptamères exprimés à la surface ou si seuls les trimères de p33 sont

capables de lier la cytokine. De plus, des études sur le ratio des isoformes p35 :p33 devraient être effectuées afin d'en déterminer l'effet sur la capacité des cellules à répondre à MIF.

Dans les sections suivantes, nous allons mettre en relief les différents éléments qui permettent la sortie du RE de l'isoforme p35 avec ce que nous avons découvert lors de nos travaux.

2.1.1.1 Le rôle de la phosphorylation

Tel que mentionné dans l'introduction, les sérines 6 et 8, présentes à proximité du motif RXR de l'isoforme p35 de la chaîne invariante, sont phosphorylées par la kinase PKC (Anderson et Roche, 1998; Kuwana et al., 1998; Anderson et al., 1999). La phosphorylation de ces deux sérines, et plus particulièrement de la sérine 8, permet la liaison de 14-3-3 et le transport antérograde de p35 (Anderson et Roche, 1998; Kuwana et al., 1998; O'Kelly et al., 2002).

On notera que le mutant p35_{S8D}, qui mime le statut de phosphorylation de la sérine 8, sort du RE en présence de DR (annexe 2 - figure1) (Kuwana et al., 1998). Toutefois, 14-3-3 ne lie pas ce mutant remettant en question le rôle de la liaison 14-3-3 à la sortie du RE de l'isoforme p35 et par conséquent le rôle de la phosphorylation dans le transport antérograde de p35 (Kuwana et al., 1998). D'autre part, nous avons mentionné que le mutant p35_{S8A}, qui est retenu dans la cellule en présence de DR, fait l'acquisition d'acide sialique signe d'un passage par l'appareil de Golgi. Ceci indique qu'en réalité la

phosphorylation de p35 n'est pas associée à sa sortie du RE mais plutôt à sa sortie de l'appareil de Golgi (Anderson et al., 1999). On suppose donc que la phosphorylation de la sérine 8 joue un rôle dans le transport antérograde de cette isoforme, la nature duquel reste à élucider.

2.1.1.2 Rôle de 14-3-3 dans le transport antérograde de p35

Étant donné qu'aucune activité enzymatique n'est attribuée à 14-3-3, on pense que celui-ci agit sur le transport et l'activité de ses partenaires via des interactions protéine-protéine spécifiques (Shikano et al., 2006). Étant donné son rôle dans le transport antérograde de diverses protéines multimériques, il semble que 14-3-3 soit capable de détecter l'assemblage adéquat de ces complexes protéiques et d'en assurer le transport antérograde (Nufer et Hauri, 2003; Yuan et al., 2003). En effet, on observe une corrélation entre la liaison de 14-3-3 et l'expression en surface de plusieurs complexes protéiques où l'une ou plusieurs des sous unités possèdent un motif RXR. Bien que plusieurs points communs existent quant à l'implication de 14-3-3 dans le transport antérograde de différentes protéines, quelques différences remarquables empêchent de conclure à un modèle de transport antérograde unique.

Il existe actuellement 3 mécanismes moléculaires l'expliquant l'implication de 14-3-3 sur l'expression en surface de protéines. Ceux-ci sont : la stabilisation d'une conformation, l'échafaudage et le masquage (Shikano et al., 2006). À noter que ces différents mécanismes moléculaires selon lesquels 14-3-3 agit sur une protéine ne sont pas mutuellement exclusifs

(Okamoto et Shikano, 2011). Nous discuterons ici de l'ensemble de ces mécanismes et de leur implication potentielle dans le transport antérograde de p35 (figure 16).

2.1.1.1.1 La stabilisation de la conformation par 14-3-3

Il a été suggéré que la rigidité intrinsèque de 14-3-3 lui permet de stabiliser la conformation de protéines associées (Shikano et al., 2006; Smith et al., 2011; Obsilova et al., 2014). Ainsi par la stabilisation d'une conformation donnée (mécanisme aussi nommé « clamping »), 14-3-3 serait capable d'altérer l'activité enzymatique ou autres propriétés des protéines ciblées (Mrowiec et Schwappach, 2006; Shikano et al., 2006). Bien que ce mécanisme soit souvent évoqué comme mode d'action possible, peu d'exemples concrets illustrent celui-ci. Un de ces rares exemples est la stabilisation de la conformation d'une pompe à protons membranaire chez la plante (Mrowiec et Schwappach, 2006; Smith et al., 2011). Pour les protéines telles que p35 possédant un motif RXR, la liaison de 14-3-3 pourrait induire un changement de conformation au niveau de la queue cytoplasmique de ces protéines de façon à déplacer le motif de rétention dans une zone dite inactive (Mrowiec et Schwappach, 2006; Shikano et al., 2006; Smith et al., 2011). Dans la figure 16A, nous avons schématisé une telle stabilisation des queues cytoplasmiques de l'isoforme p35 induite par 14-3-3.

2.1.1.1.2 Le masquage par 14-3-3

Le masquage par 14-3-3 impliquerait un blocage stérique du motif de signalisation (Smith et al., 2011). La liaison de 14-3-3 à un motif chevauchant un autre motif de localisation cellulaire permettrait de masquer de ce dernier. Le modèle proposé par O'Kelly *et al*, pour le transport antérograde des protéines à motif RXR est le suivant : β COP interagit avec le motif RXR et permet la rétention de la protéine au RE par un transport rétrograde dépendant des vésicules COPI. Suite à la phosphorylation de la protéine, la liaison de 14-3-3 empêche la liaison de β COP ce qui résulte en un transport antérograde de la protéine (figure 16B) (O'Kelly et al., 2002). On observe fréquemment ce type de chevauchement entre le motif RXR et le motif de liaison à 14-3-3 : ex. chez le récepteur désintégrine A et chez métalloprotéinase 22 (ADAM22), ainsi que chez le récepteur κ -opioïde humain (O'Kelly et al., 2002; Smith et al., 2011; Li et al., 2012). Le trafic du récepteur ADAM22 incarne parfaitement ce mécanisme où un motif de liaison à 14-3-3 englobe deux motifs RXR de rétention au RE (Smith et al., 2011). Suite à la phosphorylation d'une sérine dans le domaine cytoplasmique de ADAM22, on y observe la liaison de 14-3-3 et un transport antérograde (Godde et al., 2006; Smith et al., 2011).

Toutefois, ce modèle proposé par O'Kelly *et al*, repose principalement sur l'observation d'une liaison mutuellement exclusive de β COP et de 14-3-3 à ces protéines (O'Kelly et al., 2002). Un nombre croissant d'exemples semble rendre ce modèle incomplet.

Par exemple, les sous-unités KCNK3 et KCNK9 de canaux potassiques possèdent un motif de rétention à l'extrémité C-terminale chevauché par un motif de liaison de 14-3-3

(Zuzarte et al., 2009). Les auteurs ont démontré que la phosphorylation de la région en C-terminal des sous-unités KCNK3 et KCNK9 inhibe la liaison de β COP au motif KRR et ce, en absence de 14-3-3 (Kilisch et al., 2016). Ainsi, la phosphorylation est suffisante à masquer le motif de rétention de ces sous-unités et aucune compétition directe n'existe entre β COP et 14-3-3 (Kilisch et al., 2016).

Par ailleurs, la nature du trafic cellulaire du récepteur GABA_B infirment d'avantage l'hypothèse d'une compétition entre la liaison de β COP et 14-3-3 (Brock et al., 2005). Tel qu'observé pour l'isoforme p35, la sous-unité GB1 du récepteur possède un motif RXR, chevauché par un motif de liaison pour 14-3-3, qui assure son transport rétrograde par les vésicules COPI (Brock et al., 2005). Afin d'accéder à la surface cellulaire, la sous-unité GB1 requiert l'expression d'une seconde sous-unité GB2, tout comme p35 requiert l'expression de CMHII (Brock et al., 2005). La création de mutants de la sous-unité GB1 et de l'isoforme p35 (p35_{S8D}) pouvant lier β COP mais incapables de lier 14-3-3 a permis de démontrer que ces mutants accèdent à la surface cellulaire lorsqu'exprimés en présence de GB2 et de CMHII, respectivement (annexe 2 – figure 1B)(Kuwana et al., 1998; Brock et al., 2005). Ces résultats suggèrent que l'interaction avec 14-3-3 n'est pas requise pour l'expression en surface du récepteur GABA_B et de l'isoforme p35 de la chaîne invariante (Brock et al., 2005).

Ainsi, l'observation de liaison mutuellement exclusive de 14-3-3 et de β COP aux protéines à motifs RXR pourrait résulter d'une interaction de ces protéines dans des emplacements cellulaires distincts. En effet, la localisation cellulaire où 14-3-3 lie les différentes protéines reste inconnue. Par exemple, 14-3-3 pourrait lier les complexes p35-

CMHII à la surface cellulaire ce qui résulterait à l'observation d'une liaison mutuellement exclusive et une absence de compétition directe entre la liaison de 14-3-3 et de β COP.

2.1.1.1.3 L'échafaudage par 14-3-3

La structure dimérique de 14-3-3 suggère qu'il soit capable d'interagir avec différentes protéines, ce qui lui permettrait d'agir comme structure d'échafaudage (Shikano et al., 2006). À ce titre, 14-3-3 permettrait de mettre en relation l'isoforme p35 à une seconde protéine X, dont l'identité resterait à déterminer (figure 16C #1). Comme la queue cytoplasmique de DR β est requise pour le transport antérograde de l'isoforme p35, on pourrait imaginer que 14-3-3 permette l'échafaudage entre ces deux queues cytoplasmiques (figure 16C #2). Toutefois, ceci semble peu vraisemblable étant donné que 14-3-3, contrairement aux CMHII, ne semble pas requis pour la sortie du RE du mutant p35_{S8D} (annexe 2 – figure 1B)(Kuwana et al., 1998). De plus, selon des travaux effectués dans notre laboratoire, nous savons qu'une queue cytoplasmique de DR β longue de 3 acides aminés, la nature desquelles semble peu importante, suffit à promouvoir la sortie des complexes p35-CMHII du RE (Khalil et al., 2005). Pour ces raisons, il serait étonnant que 14-3-3 soit impliqué dans un échafaudage entre les queues cytoplasmiques de p35 et des CMHII.

En 2005, Shikano *et al*, ont démontré que l'ajout d'un motif de liaison de 14-3-3 à la sous-unité Kir2.1 de K_{ATP} résulte en un gain de fonction (Shikano et al., 2005). La liaison de

14-3-3 à ce mutant augmente son expression en surface indépendamment du masquage du motif de rétention de cette protéine (Shikano et al., 2005). Les auteurs proposent que 14-3-3 joue un rôle dans le transport antérograde des protéines et non dans le masquage de motifs de rétention au RE (Shikano et al., 2005). Or, lors d'expériences de co-immunoprécipitation, il a été démontré que 14-3-3 interagit avec différentes protéines formant les vésicules COP de type II (COPII), impliquées dans le transport antérograde du RE à l'appareil de Golgi (Pozuelo et al., 2004). Ces résultats suggèrent que le recrutement par 14-3-3 de protéines impliquées dans la machinerie de transport accompagne le gain de fonction observé (Shikano et al., 2005).

Lors de nos travaux, nous avons observé que la sortie du RE des complexes p35-CMHII dépend des vésicules COPII. On peut ainsi penser que 14-3-3 agisse comme échafaudage entre les complexes p35-CMHII et les sous unités des vésicules COPII (figure 16C #3). Cette possibilité sera adressée de manière plus approfondie dans la section 3.1.2.5 de la discussion.

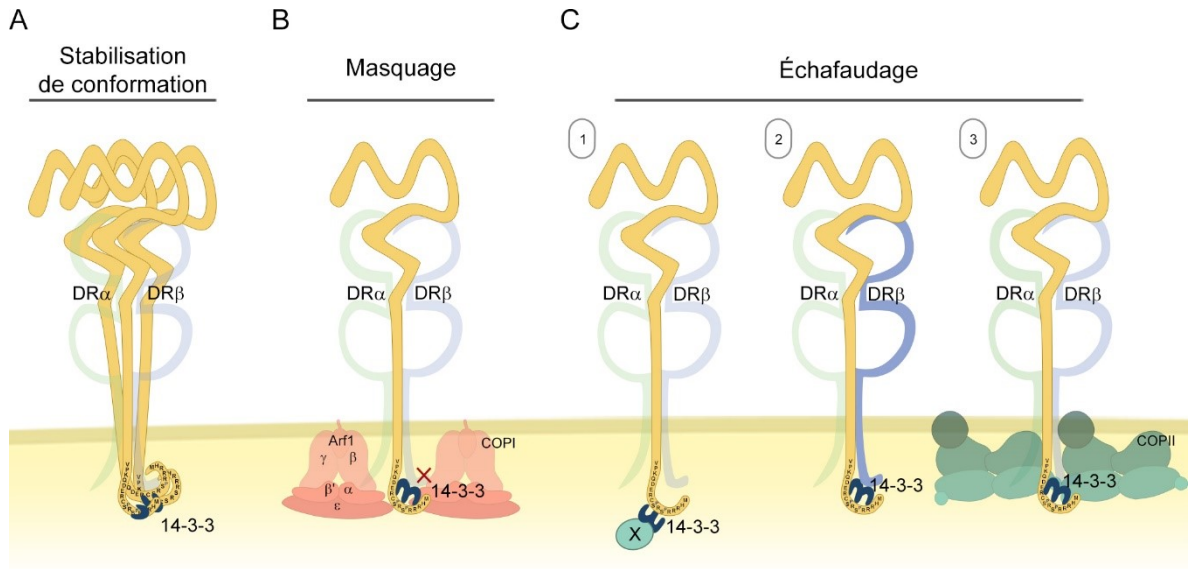


Figure 16: Mécanismes selon lesquels 14-3-3 interviendrait dans le transport antérograde de l'isoforme p35.

(A) Stabilisation de la conformation. Selon ce mécanisme, l'interaction de 14-3-3 à p35 permettrait de stabiliser une conformation de la queue cytoplasmique de manière à rendre inaccessible le motif RXR à la sous unité β COP. **(B) Masquage du motif de rétention.** Le masquage par 14-3-3 du motif de rétention au RE par les vésicules COPI représente le modèle le plus largement accepté pour les protéines, possédant un motif RXR, destinées à quitter le RE. Dans le cas de l'isoforme p35, la liaison de 14-3-3 à la forme phosphorylée de la queue cytoplasmique masque le motif RXR et permet la sortie du complexe p35-CMHII du RE. **(C) Échafaudage.** **1.** Selon ce mécanisme, la liaison de 14-3-3 à la queue cytoplasmique de p35 permettrait de recruter une tierce protéine X. **2.** On peut suggérer que la liaison de 14-3-3 à la queue cytoplasmique de p35 permet de recruter la queue de DR β , facilitant le transport antérograde du complexe. **3.** Finalement, 14-3-3 pourrait faciliter le recrutement des complexes CMHII-p35 aux vésicules COPII par échafaudage entre l'isoforme p35 et des sous-unités des complexes COPII.

3 Transport antérograde de complexes li-CMHII

Nous avons démontré que le transport antérograde entre le RE et l'appareil de Golgi des complexes li-CMHII formés autour de p33 diffère de celui des complexes formés autour de l'isoforme p35 (article 2 figure 3) (Cloutier et al., 2015). En effet, les complexes p33-CMHII sortent du RE indépendamment des vésicules COPII alors que le transport antérograde des complexes p35-CMHII, sur la base de l'action de NleA, semble dépendre de la formation des vésicules COPII. Des travaux subséquents non publiés dans le laboratoire ont démontré que l'isoforme p35, contrairement à p33, est immunoprécipitée avec des sous-unités des vésicules COPII.

Étant donné la disparité des voies antérogades empruntées par les complexes p33-CMHII et p35-CMHII, on peut se demander si l'extension de la queue cytoplasmique de p35 renferme un motif permettant le ciblage des complexes p35-CMHII aux vésicules COPII. De plus, on peut se poser la question quant à l'alternative à la voie COPII empruntée par les complexes p33-CMHII lors de leur sortie du RE. Dans les paragraphes suivants, nous tenterons de proposer des réponses à ces questions.

3.1 Transport antérograde des complexes p33-CMHII

On a longtemps limité le trafic entre le RE et l'appareil de Golgi au transport antérograde par les vésicules COPII et au transport rétrograde par les vésicules COPI. Il existe cependant des alternatives au transport par ces vésicules résultant en un mouvement

de protéines entre le RE et l'appareil de Golgi. Quelques groupes ont mis en évidence une voie alternative permettant le transport rétrograde (Girod et al., 1999; White et al., 1999; Storrie et al., 2000). En 1999, deux articles ont décrit la présence de nouvelles vésicules tubulaires, enrichies d'une petite GTPase Rab6, qui assurent un transport rétrograde de l'appareil de Golgi au RE (Girod et al., 1999; White et al., 1999). Ce trafic rétrograde est relativement plus lent que le transport associé aux vésicules COPI. Celui-ci facilite le transport rétrograde de certaines protéines dépourvues de motif de recyclage au RE, telles que les enzymes de glycosylation et la toxine Shiga (Girod et al., 1999; White et al., 1999; Storrie et Nilsson, 2002; Fossati et al., 2014). L'existence d'un tel trafic rétrograde indépendant des vésicules COPI met en relief la complexité du trafic entre le RE et l'appareil de Golgi. Ainsi nous nous sommes posés la question à savoir s'il existe un mode de transport alternatif aux vésicules COPII pouvant expliquer le transport antérograde des complexes p33-CMHII. Nous présenterons dans les sections suivantes les différentes alternatives au transport par les vésicules COPII qui pourraient intervenir dans le contexte de l'isoforme p33.

3.1.1. Transport antérograde par les vésicules COPI

Bien que ceci demeure un sujet de controverse, différents groupes ont observé l'existence d'un transport antérograde par les vésicules COPI en plus du transport rétrograde qui leur est associé (Pepperkok et al., 1993; Peter et al., 1993; Dascher et Balch, 1994; Barzilay et al., 2005). Deux groupes de recherche ont observé une accumulation au

RE et un défaut dans le transport antérograde de la protéine G du virus de la stomatite vésiculeuse (VSVG) suite à l'inhibition des vésicules COPI (figure 17 #1) (Peter et al., 1993; Dascher et Balch, 1994). Ces résultats suggèrent un rôle des vésicules COPI dans le transport antérograde de VSVG. On peut ainsi se demander si les vésicules COPI participent au transport antérograde des complexes p33-CMHII et si l'inhibition de ce transport aurait un effet sur le trafic de ces derniers.

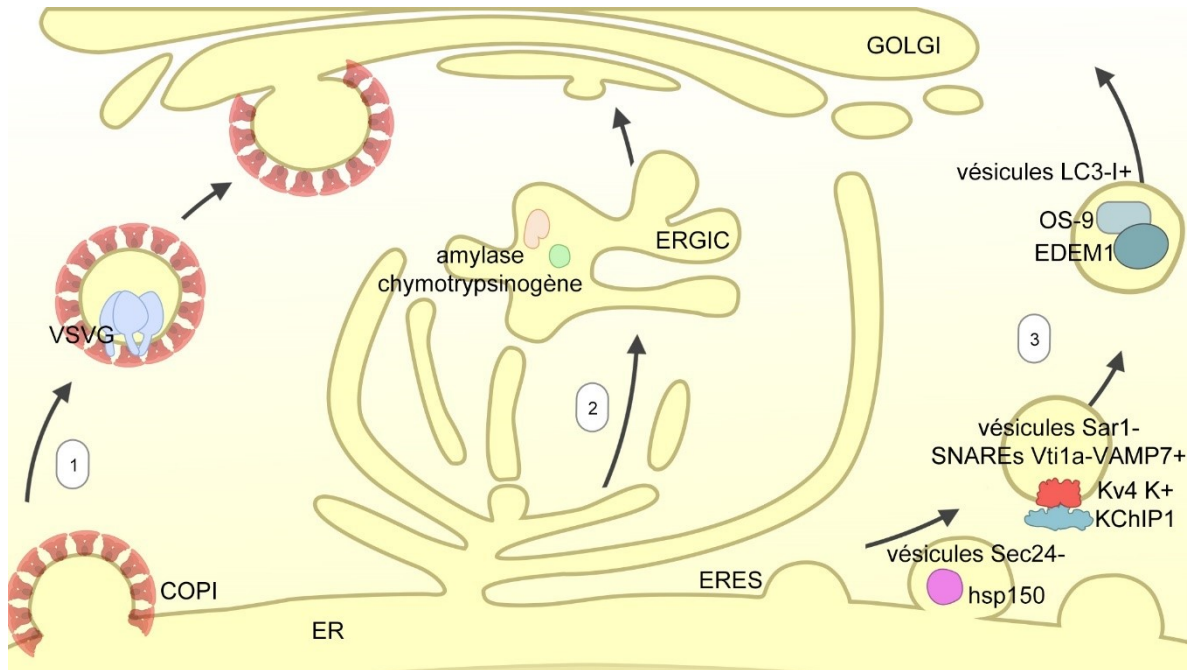


Figure 17: Schématisation des modes de transport antérogrades alternatifs aux vésicules COPII.

1. Transport antérograde par les vésicules COPI. L'accumulation de VSVG dans le RE lors de l'inhibition de la formation des vésicules COPI suggèrent l'implication de ces vésicules COPI dans le transport antérograde de VSVG. **2.** Transport antérograde par le compartiment ERGIC. Le compartiment ERGIC est caractérisé par sa localisation à proximité des ERES. L'observation de l'accumulation d'enzymes pancréatiques (l'amylase et le chymotrypsinogène) dans le compartiment ERGIC suggère un rôle de ce compartiment dans le transport antérograde de ces enzymes. **3.** Transport antérograde par les vésicules positives pour Hsp150, Vti1a-VAMP7⁺ ou LC3-I⁺. La Hsp150 accède à la surface cellulaire indépendamment de la présence de complexes COPII fonctionnels à partir des ERES. Des vésicules, possédant des complexes SNAREs Vti1a-VAMP7, assurent le transport antérograde du complexe Kv4 K⁺/KChIP1. Pour finir, deux régulateurs clés de ERAD, la protéine EDEM1 et la lectine OS-9 quittent le RE de manière à l'aide de vésicules positive pour la protéine LC3-I.

3.1.2 Transport antérograde par le compartiment ERGIC

Bien que la nature exacte du compartiment intermédiaire entre le RE et l'appareil de Golgi (ERGIC) demeure un sujet de débat, celui-ci semble être à la fois distinct et structurellement indépendant du RE et de l'appareil de Golgi (Appenzeller-Herzog et Hauri, 2006; Szul et Sztul, 2011). Ce compartiment est caractérisé par la présence du marqueur ERGIC53 et par sa proximité aux ERES (Appenzeller-Herzog et Hauri, 2006; Szul et Sztul, 2011). Bien que certaines analyses d'imageries sur des cellules vivantes suggèrent que le compartiment ERGIC est capable de se déplacer entre les ERES et l'appareil de Golgi par association à des microtubules, d'autres études suggèrent que l'ERGIC est un compartiment stable qui se situe à proximité des ERES. Ainsi, il n'existe aucun consensus quant à la maturation ou la nature stationnaire de ce compartiment (Presley et al., 1997; Scales et al., 1997; Ben-Tekaya et al., 2005). Le mode de formation de ce compartiment reste aussi incertain. Il serait formé par la fusion de vésicules COPII ou par la fusion de tubules qui émanent du RE (Watson et Stephens, 2005). Ces tubules sembleraient se former initialement au niveau des ERES, leur association subséquente aux microtubules permettrait leur détachement du RE et par le fait même l'apparition d'un transport indépendant des vésicules COPII (Watson et Stephens, 2005). En parallèle, une interconnectivité membranaire a été observée entre certaines portions du RE et du cis-Golgi se trouvant à proximité l'un de l'autre. Ceci permettrait le transport de certaines protéines entre ces deux organelles (Sesso et al., 1994; Stinchcombe et al., 1995).

Dans les cellules acineuses pancréatiques, l'amylase et le chymotrypsinogène quittent le RE de manière non-sélective et sont absentes des vésicules COPII (Martinez-Menarguez et al., 1999). On observe l'accumulation de ces deux protéines pancréatiques dans le compartiment ERGIC en route vers l'appareil de Golgi (figure 17 #2) (Martinez-Menarguez et al., 1999). Ainsi, en absence de ciblage aux vésicules COPII, on peut imaginer que la sortie des complexes p33-CMHII du RE serait dépendante du compartiment ERGIC.

3.1.3 Autres modes de transports indépendants des vésicules COPII.

On retrouve dans la littérature la description de vésicules additionnelles assurant une sortie du RE indépendamment des vésicules COPII (Nickel et Rabouille, 2009). Par exemple, chez la levure, la protéine du choc thermique 150 (Hsp150), une glycoprotéine soluble, accède à la surface cellulaire indépendamment des sous-unités Sec23 et Sec24 des complexes COPII (Fatal et al., 2004). La formation des vésicules positives pour Hsp150 s'effectue au niveau de ERES dépourvus de la sous-unité Sec24 et assure le transport de cette glycoprotéine (figure 17 #3) (Fatal et al., 2004). On observe aussi la présence d'un transport indépendant des vésicules COPII pour le canal potassique sensible au voltage (Kv4 K⁺) en complexe avec son partenaire d'interaction 1 (KCHIP1) (Hasdemir et al., 2005). Le transport antérograde du complexe Kv4 K⁺/KCHIP1 est assuré par des vésicules caractérisées par la présence des complexes SNAREs Vti1a-VAMP7 (VAMP7- protéine 7 membranaire associée aux vésicules) (figure 17 #3) (Flowerdew et Burgoyne, 2009).

Finalement, deux régulateurs clés dans la dégradation associée au RE (ERAD), la protéine α -mannosidase 1 associée à la dégradation au RE (EDEM1) et la lectine OS-9 sortent du RE indépendamment des vésicules COPII. En conditions normales, afin d'atténuer la dégradation de protéines dans le RE par ERAD, EDEM1 et OS-9 sont séquestrées dans des vésicules dérivées du RE (Zuber et al., 2007; Cali et al., 2008). Ces vésicules, formées à un endroit distinct des ERES, sont recouvertes de la protéine LC3-I normalement associée aux autophagosomes, bien qu'elles soient toutefois distinctes de ces derniers (Cali et al., 2008).

Ces différents exemples proposent l'existence de types additionnels de vésicules assurant un transport antérograde qui pourrait faciliter le transport antérograde des complexes p33-CMHII (Cali et al., 2008). Des expériences futures de type BioID pourraient permettre de mettre en lumière la nature des vésicules assurant le transport des complexes formés autour de l'isoforme p33.

3.2 Transport antérograde dépendant des COPII de p35

Nous avons suggéré que, contrairement aux complexes li-CMHII formés autour de l'isoforme p33, le trafic des complexes p35-CMHII dépend de la formation des vésicules COPII (Cloutier et al., 2015). Dans les sections suivantes nous décrirons la formation des vésicules COPII et discuterons des différents mécanismes de ciblage pouvant permettre d'expliquer le transport antérograde des complexes p35-CMHII.

3.2.1 Aperçu de la formation des vésicules COPII

Les vésicules COPII sont formées de 5 sous-unités; une petite GTPase Sar1 et deux complexes protéiques : Sec23/Sec24 et Sec13/Sec31 (figure 18) (Springer et al., 2014). La formation de ces vésicules s'effectue exclusivement aux ERES où les cargos destinés au transport antérograde sont concentrés (figure 18) (Jensen et Schekman, 2011; Szul et Sztul, 2011). Suite à son activation, Sar1-GTP recrute les sous unités Sec23 et Sec24 (Jensen et Schekman, 2011; Szul et Sztul, 2011; Springer et al., 2014). À leur tour, Sec23 et Sec24 recrutent les sous-unités Sec13 et Sec31. Le complexe Sec13/Sec31 forme la couche externe des vésicules et leur polymérisation permet la formation des vésicules COPII (figure 18) (Jensen et Schekman, 2011; Szul et Sztul, 2011; Springer et al., 2014). Initialement, il était présumé que le transport du RE vers l'appareil de Golgi par les vésicules COPII se faisait de manière non-sélective (Springer et al., 2014). Toutefois, une analyse quantitative des protéines présentes dans le RE et dans les vésicules COPII a permis d'observer un enrichissement de certaines protéines (Klumperman et al., 1998; Springer et al., 2014). On considère maintenant que la sortie du RE est un processus sélectif qui dépend de motifs de ciblage permettant le recrutement de protéines aux sites de formation de ces vésicules COPII (Dong et al., 2012). Ces motifs ont initialement été classés en deux groupes : les motifs di-acidique (DXE, EXE et EXD) et les motifs di-hydrophobique (Nishimura et al., 1999).

Depuis, d'autres motifs et mécanismes capables de promouvoir un transport aux vésicules COPII ont été identifiés (Giraudo et Maccioni, 2003; Dong et al., 2012; Wu, 2013). Nous discuterons dans les paragraphes suivants de ces différents motifs, de leur implication

et de leur présence potentielle dans l'extension de la queue cytoplasmique de l'isoforme p35 (figure 19).

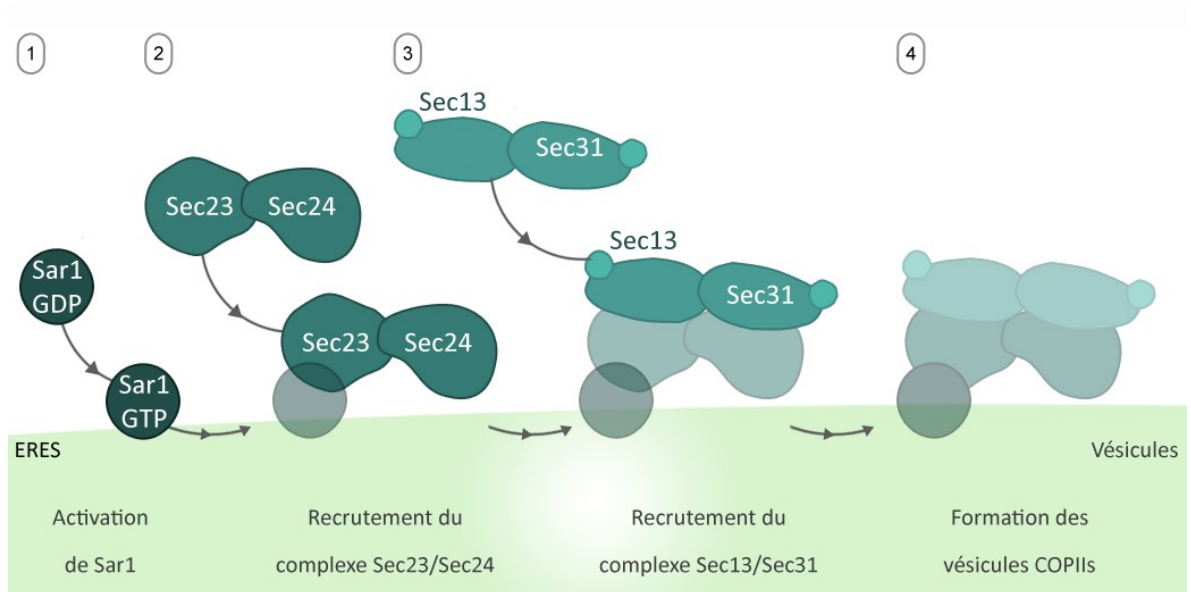


Figure 18: Étapes de la formation des vésicules COPII.

1. La GTPase Sar1-GDP est activée et est recrutée (Sar1-GTP) aux ERES. 2. Sar1-GTP recrute le complexe protéique Sec23/Sec24. 3. Sec23 et Sec24 recrutent subséquemment les sous-unités Sec13 et Sec31 qui forment la couche externe des vésicules. 4. La polymérisation du complexe Sec13/ Sec31 permet la formation des vésicules COPII.

3.2.2 Les motifs di-acidique et di-hydrophobique

L'enrichissement de certaines protéines aux ERES et dans les vésicules COPII se ferait par l'interaction de leur motif de ciblage aux sous-unités formant les vésicules COPII (Dong et al., 2012). Il existe quatre isoformes de la sous-unité Sec24, Sec24A, Sec24B, Sec24C et Sec24D qui possèdent chacun 3 sites de reconnaissance permettant le recrutement des protéines aux vésicules COPII en formation (Szul et Sztul, 2011; Dong et al., 2012; Wu, 2013).

Le premier motif de ciblage à avoir été identifié est le motif di-acidique DXE de la protéine VSVG (Nishimura et al., 1999; Wu, 2013). La présence de ce motif, chez VSVG et chez les sous-unités Kir1.1 et Kir2.1 du le canal potassique, accélère la sortie de ces protéines du RE (Ma et al., 2001; Dong et al., 2012; Wu, 2013). Ce motif et le motif di-acidique, LXXLE, lient les isoformes Sec24A et Sec24B (Mancias et Goldberg, 2008; Szul et Sztul, 2011; Dong et al., 2012).

De façon similaire, le motif di-hydrophobique, identifié chez la protéine ERGIC-53, est requis pour un transport efficace de la protéine du RE vers l'appareil de Golgi (Dong et al., 2012; Wu, 2013). On observe la liaison du motif di-hydrophobique FF aux différentes isoformes de Sec24, alors que le motif di-hydrophobique IXM lie les isoformes Sec24C et Sec24D.

Ainsi, les différentes isoformes de Sec24 reconnaissent différents motifs de ciblage aux ERES impliquant que les différentes combinaisons de cette sous-unité possèdent un effet sur la sélection des cargos (Szul et Sztul, 2011; Dong et al., 2012). Des travaux réalisés sur des souris déficientes pour les différentes isoformes de Sec24 ont permis de démontrer que ces derniers sont fonctionnellement distincts et non redondants (Geva et Schuldiner, 2014).

À ce jour, aucun motif permettant l'export du RE par les vésicules COPII des complexes p35-CMHII n'a été identifié. Comme l'expression en surface des CMHII n'est pas sensible à la présence de NleA, on pense que le motif de ciblage aux vésicules COPII se retrouve dans l'extension cytoplasmique de 16 aa de l'isoforme p35 (Cloutier et al., 2015).

La présence des acides glutamiques et aspartique aux positions 11 et 12, respectivement, correspond à un motif di-acidique, bien qu'il soit non conventionnel, et pourrait permettre le ciblage aux ERES (figure 19 #1). L'importance des acides aminés E11 et D12 dans le ciblage des complexes p35-CMHII aux vésicules COPII pourrait être testée.

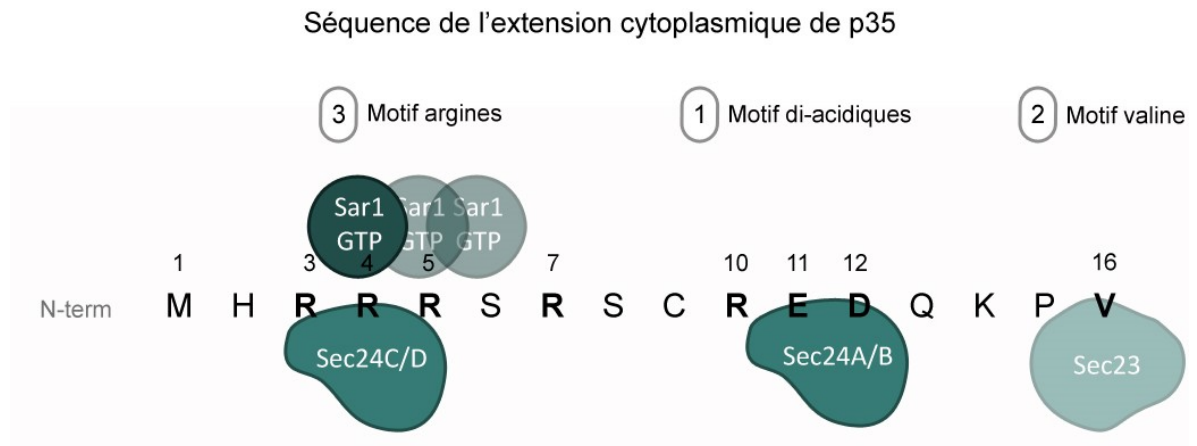


Figure 19: Identification de motifs putatifs de ciblage aux vésicules COPII dans la séquence de l'extension cytoplasmique de l'isoforme p35.

1. Les motif di-acidique. L'acide glutamique (E11) et l'acide aspartique (D12) représentent un motif di-acidique putatif non conventionnel qui pourrait permettre un ciblage aux vésicules COPII par la liaison des isoformes Sec24A et Sec24B. **2.** Le motif valine. La valine en position 16 de la queue cytoplasmique de p35 représente un motif peu vraisemblable de ciblage aux vésicules COPII par la liaison de Sec23. Le motif valine semble surtout être fonctionnel en C-terminal de protéines transmembranaires de type I. **3.** Le motif arginine. Les arginines, R3, R4, R5, R7 et R10 de la queue cytoplasmique de p35 pourraient agir à titre de motif de ciblage aux vésicules COPII. Les motifs arginines identifiés dans la littérature, permettant un transport antérograde, lient les sous-unités Sar1-GTP et Sec24C et Sec24D.

3.2.3 Le motif valine

Les molécules de classe I chargées d'un peptide sont exprimées à la surface cellulaire. Le mécanisme exact par lequel ces molécules sortent du RE et accèdent à la surface reste incertain (Boyle et al., 2006). En 2006, Boyle *et al.*, sondent par mutagenèse dirigée la queue cytoplasmique d'une CMHI non-classique, la HLA-F, à la recherche de

motifs permettant sa sortie du RE et son expression en surface (Boyle et al., 2006). Ce faisant, ils identifient une valine permettant de lier la sous-unité Sec23 des vésicules COPII (Boyle et al., 2006). L'importance d'une telle valine fut par la suite démontrée pour d'autres CMHI (HLA-A, -B et -C) (Cho et al., 2011). Sachant que 10% des protéines transmembranaires de type I possèdent une valine à l'extrémité C-terminale, les auteurs suggèrent que la présence de celle-ci pourrait représenter un mécanisme général d'export du RE par les vésicules COPII (Boyle et al., 2006).

La présence d'une valine (V16) dans la queue cytoplasmique de p35 soulève la question de son rôle potentiel dans le ciblage aux vésicules COPII (figure 19 #2). Toutefois, comme la chaîne invariante n'est pas une protéine transmembranaire de type I et comme la valine de p35 n'est pas positionnée à l'extrémité de sa queue cytoplasmique p35, il est peu vraisemblable que celle-ci agisse à titre de ciblage aux vésicules COPII.

3.2.4 Le motif di-basique

Un nouveau motif di-basique (R/KXR/K) a été identifié chez les glycotransférases, des protéines membranaires de type II, résidentes de l'appareil de Golgi (Giraud et Maccioni, 2003). Ce motif, localisé à proximité de la membrane plasmique, assure la sortie du RE par son interaction avec la sous unité Sar1 des vésicules COPII (Giraud et Maccioni, 2003).

Subséquentement, Dong *et al*, identifient un second motif basé sur la présence d'arginines et capable d'interagir avec les isoformes Sec24C et Sec24D (Dong et al., 2012).

Localisé au niveau d'une boucle intracellulaire du récepteur adrénergique α_{B2} (α_{B2}), une GPCR, ce motif est hautement conservé dans la boucle intracellulaire correspondante d'autres GPCRs. Comme pour le motif RXR de rétention au RE, Dong *et al*, démontrent que la localisation de ce motif dans la séquence protéique est peu importante (Dong et al., 2012). De plus, les auteurs démontrent que ce motif demeure fonctionnel lorsqu'il est transféré sur d'autres protéines (Dong et al., 2012). L'ensemble de ces observations suggèrent qu'un même motif arginine pourrait à la fois permettre le ciblage aux vésicules COPI et aux vésicules COPII (Dong et al., 2012).

Ainsi, la présence des différentes arginines (R3, R4, R5, R7 et R10) dans la queue cytoplasmique de p35 soulève la question de leur fonction dans le ciblage aux vésicules COPII (figure 19 #3 et figure 20A). Sachant qu'au moins deux arginines, situées aux positions 3 et 4, 4 et 5 ou 3 et 5, sont requises pour cibler p35 au RE, on peut s'interroger sur la position des arginines responsables d'un transport antérograde (Schutze et al., 1994). La possibilité que les mêmes arginines soient impliquées à la fois dans la rétention au RE et dans le transport antérograde de p35 implique la présence d'un interrupteur permettant de passer d'un statut à un autre. Ainsi on peut se demander si la phosphorylation, l'interaction de 14-3-3, le masquage par la chaîne β des CMHII ou encore l'oligomérisation des complexes li-CMHII agissent à titre d'interrupteur entre un motif de rétention au RE et un motif de ciblage aux vésicules COPII.

3.2.5 Ciblage des complexes p35-CMHII aux vésicules COPII

par 14-3-3

Comme mentionné plus haut, la protéine 14-3-3 est capable d'interagir avec différentes sous-unités impliquées dans le transport antérograde par les vésicules COPII (Pozuelo et al., 2004). De la sorte, il a été démontré que 14-3-3 facilite le transport antérograde de la protéine suppresseur de mutations d'actine 1 (SAC1) par son interaction à la sous-unité Sec24 (Bajaj et al., 2015).

Dans le contexte des complexes p35-CMHII, on peut supposer que, suite au masquage du motif RXR de p35 par la chaîne β des CMHII, la liaison de 14-3-3 permette le recrutement de ces complexes aux vésicules COPII (figure 20B). On peut ainsi s'interroger quant à l'effet de l'absence de liaison de 14-3-3 au mutant p35_{S8D} sur le transport antérograde des complexes p35_{S8D}-CMHII. Des résultats préliminaires montrent que l'expression de NleA résulte en une diminution de l'expression en surface des complexes p35_{LIMLS8D}-CMHII (annexe 2 - figure 1C et D). Toutefois, l'effet de ce facteur de virulence bactérienne sur ces complexes est moins important que celui observé pour les complexes p35-CMHII. Ceci suggère, d'une part, que l'interaction avec 14-3-3 n'assure pas le ciblage des complexes p35-CMHII aux vésicules COPII. D'autre part, on observe que la mutation de la sérine pour un acide aminés chargé négativement interfère sur le ciblage de ces complexes aux vésicules COPII. Ceci peut indiquer un rôle de la phosphorylation de la sérine 8 ou encore l'importance du motif arginine dans le ciblage aux vésicules COPII.

3.2.6 L'oligomérisation

L'absence de motifs d'export chez plusieurs protéines destinées à quitter le RE par les vésicules COPII suggère l'existence de mécanismes additionnels. L'oligomérisation a été mis de l'avant comme mécanisme complémentaire de ciblage des complexes protéiques aux vésicules COPII. À noter que plusieurs protéines qui possèdent des motifs de ciblage aux vésicules COPII oligomérisent avant de quitter le RE, tel que ERGIC-53 et VSVG, (Barlowe, 2003). Plusieurs hypothèses quant au rôle de l'oligomérisation dans le ciblage aux vésicules COPII ont été mises de l'avant. Il a été proposé que l'oligomérisation permettrait l'addition de ces motifs de ciblage de façon à accentuer leur effet. D'autre part, l'idée que l'oligomérisation permettrait de coupler différents mécanismes d'export, soit les motifs de liaison aux sous-unités COPII et l'oligomérisation elle-même, a été évoquée (Sato et Nakano, 2002, 2003). Finalement, le dernier mécanisme suggère que l'oligomérisation à elle seule permettrait la formation de vésicules COPII (Springer et al., 2014). Dans ce scénario, l'oligomérisation permettrait de courber localement la membrane vers le cytosol ce qui aurait pour effet d'induire la formation de vésicules COPII (Springer et al., 2014).

On peut se demander si l'oligomérisation joue un rôle dans le ciblage des complexes p35-CMHII aux vésicules COPII (figure 20C). La présence de trimères mixtes de la chaîne invariante (p33/p35) suppose la présence d'un, deux ou trois exemplaires de p35 dans le trimère ainsi que la formation de complexes li-CMHII à stœchiométries variables, soient des pentamères, des heptamères et des nonamères. Nous avons démontré que ces différentes stœchiométries des complexes li-CMHII sont retenues au RE lors de l'inhibition de la

formation des vésicules COPII (article 2 figure 3) (Cloutier et al., 2015). Ces résultats suggèrent que l'oligomérisation, ainsi que l'addition des motifs de ciblage, ne sont pas requis au transport antérograde des complexes li-CMHII comprenant au moins une isoforme p35.

De plus, ces résultats suggèrent que le ciblage aux vésicules COPII est assuré par la présence d'une seule copie de l'isoforme p35 et indépendant des différentes stœchiométries de li-CMHII. Ainsi, aucune distinction n'existerait entre le trafic du RE à l'appareil de Golgi des pentamères et des nonamères formés autour de trimères mixtes de la chaîne invariante (p33/p35). En revanche, le transport antérograde d'un pentamère formé autour d'un trimère p33 est indépendant des vésicules COPII alors que le transport dans le contexte d'un pentamère formé autour du trimère mixte $p33_2/p35_1$ dépendant des vésicules COPII.

Des travaux effectués sur le transporteur 1 de GABA (GAT-1) ont démontré que la présence d'un motif permettant la liaison à la sous-unité Sec24D et l'oligomérisation du transporteur sont toutes deux essentielles à sa sortie dépendante des vésicules COPII du RE (Farhan et al., 2007). Des mutations supprimant l'une ou l'autre de ces deux caractéristiques du transporteur résultent en une protéine retenue au RE. Ainsi, un mutant de GAT1 qui n'oligomérisé pas mais qui interagit avec Sec24D ne quitte pas le RE.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons démontré que l'ensemble des motifs RXR de p35 présents dans un trimère doivent être masqués de manière directe par une chaîne DR β afin d'assurer un transport antérograde (article 2 figure 2) (Cloutier et al., 2015).

Ainsi, le transport antérograde des complexes p35-CMHII requiert d'une part, une oligomérisation permettant le masquage des motifs de rétention et, d'autre part, un ciblage aux vésicules COPII. Afin de mieux comprendre la séquence d'événements permettant la sortie des complexes p35-CMHII du RE, il serait intéressant d'évaluer la liaison d'une sous-unité COPII à un complexe p35-CMHII pour lequel le masquage direct du motif de rétention est impossible.

Dans cette section, nous avons tenté de décrire les différents mécanismes de ciblage potentiels de l'isoforme p35 de la chaîne invariante aux vésicules COPII qui pourraient expliquer le transport antérograde des complexes p35-CMHII par les vésicules COPII. Nous avons également noté que les complexes formés autour de trimères possédant au moins une copie de l'isoforme p35 sont dépendants des vésicules COPII pour leur transport vers la surface cellulaire. La figure 20 illustre les différents mécanismes que nous avons décrit selon lesquels ce transport via les vésicules COPII pourrait se faire. Des travaux supplémentaires seront requis afin de déterminer la nature et la fonction des voies empruntées par les différentes isoformes de la chaîne invariante

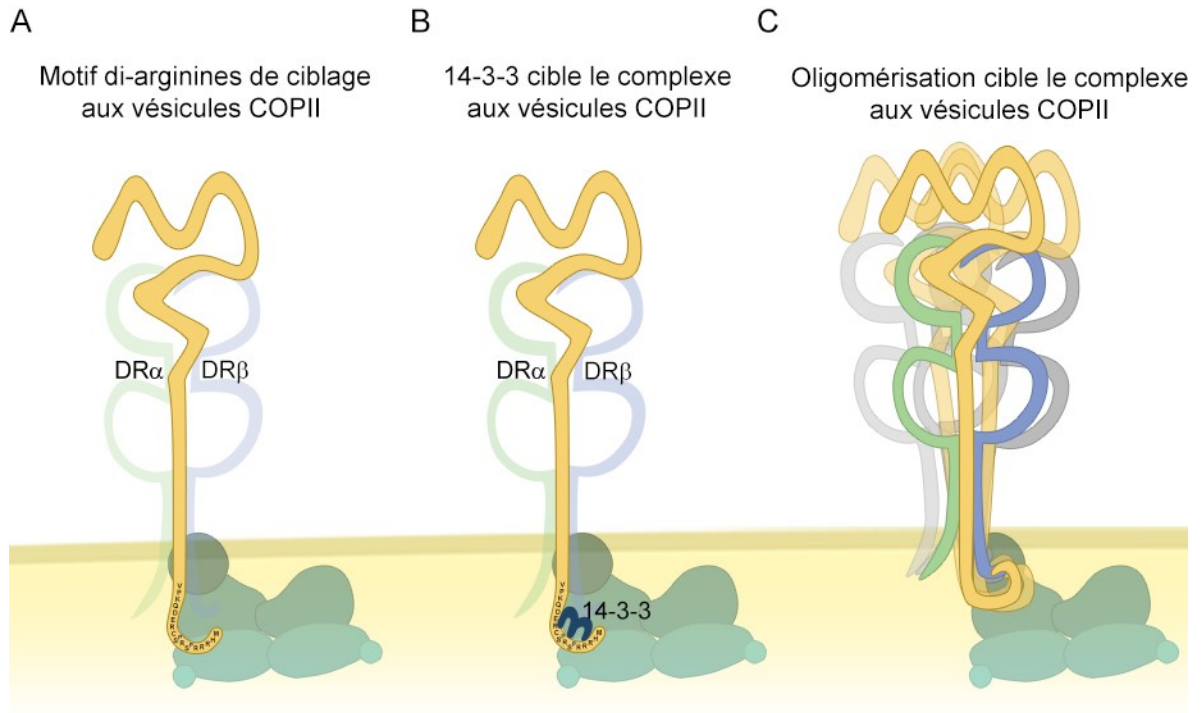


Figure 20: Illustration des différents mécanismes pouvant promouvoir le transport antérograde des complexes p35-CMHII par les vésicules COPII.

(A) Ciblage aux vésicules COPII par le motif arginine. La présence des différentes arginines dans la queue cytoplasmique de p35 pourrait permettre le ciblage des complexes aux vésicules COPII. Il a été observé que de tels motifs sont capables d'interagir aux sous-unités Sar1 et Sec24 des complexes COPII (Giraudo et Maccioni, 2003; Dong et al., 2012). **(B)** Ciblage aux vésicules COPII par 14-3-3. Un échafaudage entre la queue cytoplasmique de p35 et une sous-unité des vésicules COPII par 14-3-3 pourrait permettre le transport antérograde des complexes p35-CMHII. Il a été démontré que 14-3-3 interagit avec les sous-unités Sec23A, Sec23B et Sec24 formant les vésicules COPII (Pozuelo et al., 2004). **(C)** Ciblage aux vésicules COPII par oligomérisation. L'oligomérisation des complexes p35-CMHII permettrait leur ciblage aux vésicules COPII.

CHAPITRE 4 : CONCLUSION

La séquence exacte des événements menant à la sortie du RE des complexes li-CMHII demande à être clarifié. Dans le cas de l'isoforme p33, les chaînes $\alpha\beta$ des CMHII s'associent autour d'un homotrimère de façon à générer un pentamère. Un tel complexe est compétent à sortir du RE. Ceci survient incontestablement dans certaines conditions expérimentales et dans certaines cellules. Sans aucun doute, le ratio li/CMHII représente un facteur qui affecte la stœchiométrie finale des complexes qui sortent du RE. Comme la chaîne invariante est souvent exprimée en excès et que la moitié du pool de cette dernière est sous la forme de trimères de p33, quelques CMHII peuvent s'associer à leur propre trimère de la chaîne invariante et sortir sous la forme de pentamères (Anderson et al., 1999). Ainsi dans un contexte d'inflammation, il pourrait être bénéfique d'augmenter rapidement l'expression en surface des CMHII résultant d'une augmentation de l'expression de la chaîne invariante. Bien que l'expression de la chaîne invariante soit coréglée avec celle des CMHII, la chaîne invariante est aussi spécifiquement induite par certains facteurs, tels que NF- κ B et le lipopolysaccharide (Pessara et Koch, 1990; Klasen et al., 2018).

La présence du motif di-arginine de rétention au RE est généralement associée à un contrôle de qualité de l'assemblage de complexes multiprotéiques. Plus récemment, ce motif de rétention a été associé à un mécanisme d'augmentation rapide de l'expression en surface, suite à un signal d'activation, du récepteur nAChR (Henderson et al., 2014). Des travaux supplémentaires seront requis pour déterminer la fonction de l'isoforme p35 chez l'humain afin de déterminer si ce dernier est associé à un contrôle de qualité lors de la

formation des complexes li-CMHII ou encore, s'il permet de créer un réservoir de complexes li-CMHII dans le RE qui, suite à un stimulus, la nature duquel reste à identifier, résulte en une augmentation rapide de l'expression à la surface. Entre autres, le contrôle de la phosphorylation dans certaines conditions physiologiques pourrait résulter en une expression rapide des molécules de classe II à la surface.

Le ratio p33/p35 aura aussi pour effet de moduler la stœchiométrie des complexes. La proportion relative de ces deux isoformes semble pouvoir être régulée étant donné que la surexpression de p35 a été observée dans des leucémies lymphoïdes chroniques (Veenstra et al., 1993, 1996). Si l'isoforme p35 joue un rôle dans l'évasion tumorale vis-à-vis du système immunitaire par la modulation de la stœchiométrie des complexes reste à être déterminé. Une variation dans l'expression de p35 a été suggérée comme la cause d'une présentation antigénique aberrante et contribuant au développement de diabète de type 1 (Yan et al., 2003). Nous avons aussi démontré dans le laboratoire (résultats non publiés) que, lorsqu'exprimée seule, l'isoforme p35 est incapable de présenter l'épitope HA₃₀₆₋₃₁₈ de l'hémagglutinine sur les CMHII. Comme celui-ci régule l'expression en surface des trimères de la chaîne invariante (Warmerdam et al., 1996), il sera intéressant de déterminer l'impact de cette isoforme sur les autres fonctions de la chaîne, telles que celle de récepteur à la surface cellulaire.

Plusieurs travaux font appel à la chaîne invariante comme agent de livraison d'antigènes aux CMHII (Mensali et al., 2019). Afin d'augmenter l'efficacité de la livraison d'antigènes par la chaîne invariante, plusieurs stratégies ont été testées. À la lumière de

nos résultats, il serait intéressant de tester l'isoforme p35 comme système de livraison d'antigènes étant donné que p35 se doit d'être saturée de CMHII afin d'atteindre le système endosomal.

Des études supplémentaires adressant le transport et les caractéristiques fonctionnelles de p35 dans le développement de maladie sont nécessaires.

BIBLIOGRAPHIE

- Alexandropoulos, K., and Danzl, N.M. (2012). Thymic epithelial cells: antigen presenting cells that regulate T cell repertoire and tolerance development. *Immunol Res* 54, 177-190.8259
- Amigorena, S., Webster, P., Drake, J., Newcomb, J., Cresswell, P., and Mellman, I. (1995). Invariant chain cleavage and peptide loading in major histocompatibility complex class II vesicles. *J Exp Med* 181, 1729-1741.1370
- Amodio, G., and Gregori, S. (2012). Dendritic cells a double-edge sword in autoimmune responses. *Front Immunol* 3, 233.8317
- Anczurowski, M., and Hirano, N. (2018). Mechanisms of HLA-DP Antigen Processing and Presentation Revisited. *Trends Immunol* 39, 960-964.
- Anderson, H.A., Bergstralh, D.T., Kawamura, T., Blauvelt, A., and Roche, P.A. (1999). Phosphorylation of the invariant chain by protein kinase C regulates MHC class II trafficking to antigen-processing compartments. *J Immunol* 163, 5435-5443.4350
- Anderson, H.A., Hiltbold, E.M., and Roche, P.A. (2000). Concentration of MHC class II molecules in lipid rafts facilitates antigen presentation. *Nat Immunol* 1, 156-162.4495
- Anderson, H.A., and Roche, P.A. (1998). Phosphorylation regulates the delivery of MHC class II invariant chain complexes to antigen processing compartments. *J Immunol* 160, 4850-4858.3394
- Anderson, K.S., and Cresswell, P. (1994). A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *EMBO J* 13, 675-682.696
- Andersson, H., Kappeler, F., and Hauri, H.P. (1999). Protein targeting to endoplasmic reticulum by dilysine signals involves direct retention in addition to retrieval. *J Biol Chem* 274, 15080-15084.4630
- Appenzeller-Herzog, C., and Hauri, H.P. (2006). The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J Cell Sci* 119, 2173-2183.
- Arndt, S.O., Vogt, A.B., Markovic-Plese, S., Martin, R., Moldenhauer, G., Wolpl, A., Sun, Y., Schadendorf, D., Hammerling, G.J., and Kropshofer, H. (2000). Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells. *EMBO J* 19, 1241-1251.4131
- Arneson, L.S., and Miller, J. (1995). Efficient endosomal localization of major histocompatibility complex class II-invariant chain complexes requires multimerization of the invariant chain targeting sequence. *J Cell Biol* 129, 1217-1228.1428
- Arneson, L.S., and Miller, J. (2007). The chondroitin sulfate form of invariant chain trimerizes with conventional invariant chain and these complexes are rapidly transported from the trans-Golgi network to the cell surface. *Biochem J* 406, 97-103.8309
- Arunachalam, B., and Cresswell, P. (1995). Molecular requirements for the interaction of class II major histocompatibility complex molecules and invariant chain with calnexin. *J Biol Chem* 270, 2784-2790.3481
- Arunachalam, B., Lamb, C.A., and Cresswell, P. (1993). Transport properties of free and MHC class II associated oligomers containing different isoforms of human invariant chain. *Int Immunol* 6, 439-451.637

- Ashman, J.B., and Miller, J. (1999). A role for the transmembrane domain in the trimerization of the MHC class II-associated invariant chain. *J Immunol* **163**, 2704-2712.4520
- Ashton-Rickardt, P.G., Van Kaer, L., Schumacher, T.N., Ploegh, H.L., and Tonegawa, S. (1993). Peptide contributes to the specificity of positive selection of CD8+ T cells in the thymus. *Cell* **73**, 1041-1049.2506
- Bajaj, P.K., Wang, J., Blagoveshchenskaya, A., Lim, L., Madhusudhan, M.S., Mayinger, P., and Schekman, R. (2015). Phosphoregulatory protein 14-3-3 facilitates SAC1 transport from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E3199-E3206.8342
- Bakela, K., Kountourakis, N., Aivaliotis, M., and Athanassakis, I. (2015). Soluble MHC-II proteins promote suppressive activity in CD4+ T cells. *Immunology* **144**, 158-169.
- Bando, H., Matsumoto, G., Bando, M., Muta, M., Ogawa, T., Funata, N., Nishihira, J., Koike, M., and Toi, M. (2002). Expression of macrophage migration inhibitory factor in human breast cancer: association with nodal spread. *Jpn J Cancer Res* **93**, 389-396.8311
- Bania, J., Gatti, E., Lelouard, H., David, A., Cappello, F., Weber, E., Camosseto, V., and Pierre, P. (2003). Human cathepsin S, but not cathepsin L, degrades efficiently MHC class II-associated invariant chain in nonprofessional APCs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6664-6669.6338
- Barlowe, C. (2003). Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol* **13**, 295-300.8332
- Barrera, C.A., Beswick, E.J., Sierra, J.C., Bland, D., Espejo, R., Mifflin, R., Adegboyega, P., Crowe, S.E., Ernst, P.B., and Reyes, V.E. (2005). Polarized expression of CD74 by gastric epithelial cells. *J Histochem Cytochem* **53**, 1481-1489.7787
- Bartel, M., Schafer, A., Stevers, L.M., and Ottmann, C. (2014). Small molecules, peptides and natural products: getting a grip on 14-3-3 protein-protein modulation. *Future Med Chem* **6**, 903-921.8353
- Barzilay, E., Ben-Califa, N., Hirschberg, K., and Neumann, D. (2005). Uncoupling of brefeldin a-mediated coatamer protein complex-I dissociation from Golgi redistribution. *Traffic* **6**, 794-802.8374
- Becker-Herman, S., Arie, G., Medvedovsky, H., Kerem, A., and Shachar, I. (2005). CD74 is a member of the regulated intramembrane proteolysis-processed protein family. *Mol Biol Cell* **16**, 5061-5069.8157
- Beers, C., Burich, A., Kleijmeer, M.J., Griffith, J.M., Wong, P., and Rudensky, A.Y. (2005). Cathepsin S controls MHC class II-mediated antigen presentation by epithelial cells in vivo. *J Immunol* **174**, 1205-1212.8225
- Beisner, D.R., Langerak, P., Parker, A.E., Dahlberg, C., Otero, F.J., Sutton, S.E., Poirot, L., Barnes, W., Young, M.A., Niessen, S., *et al.* (2013). The intramembrane protease Sppl2a is required for B cell and DC development and survival via cleavage of the invariant chain. *J Exp Med* **210**, 23-30.8235
- Ben-Tekaya, H., Miura, K., Pepperkok, R., and Hauri, H.P. (2005). Live imaging of bidirectional traffic from the ERGIC. *J Cell Sci* **118**, 357-367.8363
- Benaroch, P., Yilla, M., Raposo, G., Ito, K., Miwa, K., Geuze, H.J., and Ploegh, H.L. (1995). How MHC class II molecules reach the endocytic pathway. *EMBO J* **14**, 37-49.3019

- Benedek, G., Meza-Romero, R., Andrew, S., Leng, L., Burrows, G.G., Bourdette, D., Offner, H., Bucala, R., and Vandenbark, A.A. (2013). Partial MHC class II constructs inhibit MIF/CD74 binding and downstream effects. *Eur J Immunol* 43, 1309-1321.8242
- Berger, A.C., and Roche, P.A. (2009). MHC class II transport at a glance. *J Cell Sci* 122, 1-4.7489
- Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J.L., Zernecke, A., Koenen, R.R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., *et al.* (2007). MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med* 13, 587-596.6215
- Bertolino, P., Staschewski, M., Trescol-Biémont, M.-C., Freisewinkel, I.M., Schenck, K., Chrétien, I., Forquet, F., Gerlier, D., Rabourdin-Combe, C., and Koch, N. (1995). Deletion of a C-terminal sequence of the class II-associated invariant chain abrogates invariant chains oligomer formation and class II antigen presentation. *J Immunol* 154, 5620-5629.1448
- Beswick, E.J., Bland, D.A., Suarez, G., Barrera, C.A., Fan, X., and Reyes, V.E. (2005a). *Helicobacter pylori* binds to CD74 on gastric epithelial cells and stimulates interleukin-8 production. *Infect Immun* 73, 2736-2743.7788
- Beswick, E.J., Das, S., Pinchuk, I.V., Adegboyega, P., Suarez, G., Yamaoka, Y., and Reyes, V.E. (2005b). *Helicobacter pylori*-induced IL-8 production by gastric epithelial cells up-regulates CD74 expression. *J Immunol* 175, 171-176.7355
- Beswick, E.J., Pinchuk, I.V., Minch, K., Suarez, G., Sierra, J.C., Yamaoka, Y., and Reyes, V.E. (2006a). The *Helicobacter pylori* urease B subunit binds to CD74 on gastric epithelial cells and induces NF-kappaB activation and interleukin-8 production. *Infect Immun* 74, 1148-1155.7786
- Beswick, E.J., Pinchuk, I.V., Suarez, G., Sierra, J.C., and Reyes, V.E. (2006b). *Helicobacter pylori* CagA-dependent macrophage migration inhibitory factor produced by gastric epithelial cells binds to CD74 and stimulates procarcinogenic events. *J Immunol* 176, 6794-6801.6219
- Beswick, E.J., and Reyes, V.E. (2009). CD74 in antigen presentation, inflammation, and cancers of the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 15, 2855-2861.7353
- Bevec, T., Stoka, V., Pungercic, G., Dolenc, I., and Turk, V. (1996). Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L. *J Exp Med* 183, 1331-1338.2005
- Bijlmakers, M.E., Benaroch, P., and Ploegh, H.L. (1994). Mapping functional regions in the luminal domain of the class II-associated invariant chain. *J Exp Med* 180, 623-629.948
- Bikoff, E.K., Germain, R.N., and Robertson, E.J. (1995). Allelic differences affecting invariant chain dependency of MHC class II subunit assembly. *Immunity* 2, 301-310.7766
- Binsky, I., Haran, M., Starlets, D., Gore, Y., Lantner, F., Harpaz, N., Leng, L., Goldenberg, D.M., Shvidel, L., Berrebi, A., *et al.* (2007). IL-8 secreted in a macrophage migration-inhibitory factor- and CD74-dependent manner regulates B cell chronic lymphocytic leukemia survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13408-13413.6213
- Bloom, B.R., and Bennett, B. (1966). Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 153, 80-82.8307
- Blum, J.S., and Cresswell, P. (1988). Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 3975-3979.868

- Boes, M., Cuvillier, A., and Ploegh, H. (2004). Membrane specializations and endosome maturation in dendritic cells and B cells. *Trends Cell Biol* *14*, 175-183.8277
- Bohley, P., and Seglen, P.O. (1992). Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia* *48*, 151-157.8216
- Boss, J.M., and Jensen, P.E. (2003). Transcriptional regulation of the MHC class II antigen presentation pathway. *Curr Opin Immunol* *15*, 105-111.8243
- Boyle, L.H., Gillingham, A.K., Munro, S., and Trowsdale, J. (2006). Selective export of HLA-F by its cytoplasmic tail. *J Immunol* *176*, 6464-6472.6615
- Bremnes, B., Madsen, T., Gedde-Dahl, M., and Bakke, O. (1994). An LI and ML motif in the cytoplasmic tail of the MHC-associated invariant chain mediate rapid internalization. *J Cell Sci* *107 (Pt 7)*, 2021-2032.4907
- Bremnes, T., Lauvrak, V., Lindqvist, B., and Bakke, O. (1998). A region from the medium chain adaptor subunit (mu) recognizes leucine- and tyrosine-based sorting signals. *J Biol Chem* *273*, 8638-8645.8264
- Brock, C., Boudier, L., Maurel, D., Blahos, J., and Pin, J.P. (2005). Assembly-dependent surface targeting of the heterodimeric GABAB Receptor is controlled by COPI but not 14-3-3. *Mol Biol Cell* *16*, 5572-5578.8286
- Cali, T., Galli, C., Olivari, S., and Molinari, M. (2008). Segregation and rapid turnover of EDEM1 by an autophagy-like mechanism modulates standard ERAD and folding activities. *Biochem Biophys Res Commun* *371*, 405-410.8365
- Castellino, F., and Germain, R.N. (1995). Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. *Immunity* *2*, 73-88.1731
- Castellino, F., Han, R., and Germain, R.N. (2001). The transmembrane segment of invariant chain mediates binding to MHC class II molecules in a CLIP-independent manner. *Eur J Immunol* *31*, 841-850.4610
- Cella, M., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1997). Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* *9*, 10-16.3024
- Chen, X., Laur, O., Kambayashi, T., Li, S., Bray, R.A., Weber, D.A., Karlsson, L., and Jensen, P.E. (2002). Regulated expression of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DO during antigen-dependent and antigen-independent phases of B cell development. *J Exp Med* *195*, 1053-1062.4562
- Chervonsky, A., and Sant, A.J. (1995). In the absence of major histocompatibility complex class II molecules, invariant chain is translocated to late endocytic compartments by autophagy. *Eur J Immunol* *25*, 911-918.1420
- Cho, S., Ryoo, J., Jun, Y., and Ahn, K. (2011). Receptor-mediated ER export of human MHC class I molecules is regulated by the C-terminal single amino acid. *Traffic* *12*, 42-55.8338
- Chopin, M., Allan, R.S., and Belz, G.T. (2012). Transcriptional regulation of dendritic cell diversity. *Front Immunol* *3*, 26.8314
- Claesson-Welsh, L., and Peterson, P.A. (1985). Implications of the invariant gamma-chain on the intracellular transport of class II histocompatibility antigens. *J Immunol* *135*, 3551-3557.8263

- Clark, M.R., Massenburg, D., Siemasko, K., Hou, P., and Zhang, M. (2004). B-cell antigen receptor signaling requirements for targeting antigen to the MHC class II presentation pathway. *Curr Opin Immunol* 16, 382-387.8278
- Cloutier, M., Gauthier, C., Fortin, J.S., Geneve, L., Kim, K., Gruenheid, S., Kim, J., and Thibodeau, J. (2015). ER egress of invariant chain isoform p35 requires direct binding to MHCII molecules and is inhibited by the NleA virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Hum Immunol* 76, 292-296.8341
- Cloutier, M., Gauthier, C., Fortin, J.S., and Thibodeau, J. (2014). The invariant chain p35 isoform promotes formation of nonameric complexes with MHC II molecules. *Immunol Cell Biol* 92, 553-556.8320
- Cosson, P., and Letourneur, F. (1994). Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* 263, 1629-1631.4596
- Costantino, C.M., Hang, H.C., Kent, S.C., Hafler, D.A., and Ploegh, H.L. (2008). Lysosomal cysteine and aspartic proteases are heterogeneously expressed and act redundantly to initiate human invariant chain degradation. *J Immunol* 180, 2876-2885.8219
- Costantino, C.M., Ploegh, H.L., and Hafler, D.A. (2009). Cathepsin S regulates class II MHC processing in human CD4+ HLA-DR+ T cells. *J Immunol* 183, 945-952.8222
- Cresswell, P. (1985). Intracellular class II HLA antigens are accessible to transferrin-neuraminidase conjugates internalized by receptor-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 8188-8192.8046
- Crotzer, V.L., and Blum, J.S. (2009). Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation. *J Immunol* 182, 3335-3341.7316
- Damke, H., Baba, T., Warnock, D.E., and Schmid, S.L. (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol* 127, 915-934.
- Dascher, C., and Balch, W.E. (1994). Dominant inhibitory mutants of ARF1 block endoplasmic reticulum to Golgi transport and trigger disassembly of the Golgi apparatus. *J Biol Chem* 269, 1437-1448.8373
- David, J.R. (1966). Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 56, 72-77.8308
- Davidson, H.W. (1999). Direct transport of newly synthesized HLA-DR from the trans-Golgi network to major histocompatibility complex class II containing compartments (MIICS) demonstrated using a novel tyrosine-sulfated chimera. *J Biol Chem* 274, 27315-27322.8269
- De Gassart, A., Camosseto, V., Thibodeau, J., Ceppi, M., Catalan, N., Pierre, P., and Gatti, E. (2008). MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*.5967
- De Kretser, T.A., Crumpton, M.J., Bodmer, J.G., and Bodmer, W.F. (1982). Two-dimensional gel analysis of the polypeptides precipitated by a polymorphic HLA-DR1,2,w6 monoclonal antibody: evidence for a third locus. *Eur J Immunol* 12, 600-606.8152
- De Smedt, T., Pajak, B., Muraille, E., Lespagnard, L., Heinen, E., De Baetselier, P., Urbain, J., Leo, O., and Moser, M. (1996). Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med* 184, 1413-1424.
- Dengjel, J., Schoor, O., Fischer, R., Reich, M., Kraus, M., Muller, M., Kreymborg, K., Altenberend, F., Brandenburg, J., Kalbacher, H., *et al.* (2005). Autophagy promotes MHC

class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7922-7927.7820

Denzin, L.K., and Cresswell, P. (1995). HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II ab dimers and facilitates peptide loading. *Cell* 82, 155-165.1512

Denzin, L.K., Fallas, J.L., Prendes, M., and Yi, W. (2005). Right place, right time, right peptide: DO keeps DM focused. *Immunol Rev* 207, 279-292.5407

Denzin, L.K., Hammond, C., and Cresswell, P. (1996). HLA-DM interactions with intermediates in HLA-DR maturation and a role for HLA-DM in stabilizing empty HLA-DR molecules. *J Exp Med* 184, 2153-2165.2891

Denzin, L.K., Khan, A.A., Viridis, F., Wilks, J., Kane, M., Beilinson, H.A., Dikiy, S., Case, L.K., Roopenian, D., Witkowski, M., *et al.* (2017). Neutralizing Antibody Responses to Viral Infections Are Linked to the Non-classical MHC Class II Gene H2-Ob. *Immunity* 47, 310-322 e317.

Denzin, L.K., Sant'Angelo, D.B., Hammond, C., Surman, M.J., and Cresswell, P. (1997). Negative regulation by HLA-DO of MHC Class II-restricted antigen processing. *Science* 278, 106-109.3300

Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., and Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol* 2, 1032-1039.

Deshaies, F., Brunet, A., Diallo, D.A., Denzin, L.K., Samaan, A., and Thibodeau, J. (2005). A point mutation in the groove of HLA-DO allows egress from the endoplasmic reticulum independent of HLA-DM. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6443-6448.5409

Deussing, J., Roth, W., Saftig, P., Peters, C., Ploegh, H.L., and Villadangos, J.A. (1998). Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4516-4521.8217

Dixon, A.M., Stanley, B.J., Matthews, E.E., Dawson, J.P., and Engelman, D.M. (2006). Invariant chain transmembrane domain trimerization: a step in MHC class II assembly. *Biochemistry* 45, 5228-5234.8143

Dong, C., Nichols, C.D., Guo, J., Huang, W., Lambert, N.A., and Wu, G. (2012). A triple arg motif mediates alpha(2B)-adrenergic receptor interaction with Sec24C/D and export. *Traffic* 13, 857-868.8290

Dugast, M., Toussaint, H., Dousset, C., and Benaroch, P. (2005). AP2 clathrin adaptor complex, but not AP1, controls the access of the major histocompatibility complex (MHC) class II to endosomes. *J Biol Chem* 280, 19656-19664.7659

Ehlers, M.D., Tingley, W.G., and Huganir, R.L. (1995). Regulated subcellular distribution of the NR1 subunit of the NMDA receptor. *Science* 269, 1734-1737.8299

El-Sukkari, D., Wilson, N.S., Hakansson, K., Steptoe, R.J., Grubb, A., Shortman, K., and Villadangos, J.A. (2003). The protease inhibitor cystatin C is differentially expressed among dendritic cell populations, but does not control antigen presentation. *J Immunol* 171, 5003-5011.

El-Turk, F., Cascella, M., Ouertatani-Sakouhi, H., Narayanan, R.L., Leng, L., Bucala, R., Zweckstetter, M., Rothlisberger, U., and Lashuel, H.A. (2008). The conformational flexibility of the carboxy terminal residues 105-114 is a key modulator of the catalytic activity and stability of macrophage migration inhibitory factor. *Biochemistry* 47, 10740-10756.8313

- English, L., Chemali, M., Duron, J., Rondeau, C., Laplante, A., Gingras, D., Alexander, D., Leib, D., Norbury, C., Lippe, R., *et al.* (2009). Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol* 10, 480-487.7409
- Eugster, A., Frigerio, G., Dale, M., and Duden, R. (2004). The alpha- and beta'-COP WD40 domains mediate cargo-selective interactions with distinct di-lysine motifs. *Mol Biol Cell* 15, 1011-1023.8285
- Farhan, H., Reiterer, V., Korkhov, V.M., Schmid, J.A., Freissmuth, M., and Sitte, H.H. (2007). Concentrative export from the endoplasmic reticulum of the gamma-aminobutyric acid transporter 1 requires binding to SEC24D. *J Biol Chem* 282, 7679-7689.8355
- Fatal, N., Karhinen, L., Jokitalo, E., and Makarow, M. (2004). Active and specific recruitment of a soluble cargo protein for endoplasmic reticulum exit in the absence of functional COPII component Sec24p. *J Cell Sci* 117, 1665-1673.8368
- Ferlazzo, G., and Morandi, B. (2014). Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells. *Front Immunol* 5, 159.8316
- Fiebiger, E., Meraner, P., Weber, E., Fang, I.F., Stingl, G., Ploegh, H., and Maurer, D. (2001). Cytokines regulate proteolysis in major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by dendritic cells. *J Exp Med* 193, 881-892.8224
- Fineschi, B., Arneson, L.S., Naujokas, M.F., and Miller, J. (1995). Proteolysis of major histocompatibility complex class II- associated invariant chain is regulated by the alternatively spliced gene product, p41. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 10257-10261.1637
- Flowerdew, S.E., and Burgoyne, R.D. (2009). A VAMP7/Vti1a SNARE complex distinguishes a non-conventional traffic route to the cell surface used by KChIP1 and Kv4 potassium channels. *Biochem J* 418, 529-540.8367
- Fooksman, D.R. (2014). Organizing MHC Class II Presentation. *Front Immunol* 5, 158.8322
- Fortin, J.F. (2013). Antigen and superantigen presentation as defined by the MHCIi-accessory proteins and associated-peptides (Université de Montréal), pp. 1-256.8321
- Fossati, M., Colombo, S.F., and Borgese, N. (2014). A positive signal prevents secretory membrane cargo from recycling between the Golgi and the ER. *EMBO J* 33, 2080-2097.8359
- Gaynor, E.C., and Emr, S.D. (1997). COPI-independent anterograde transport: cargo-selective ER to Golgi protein transport in yeast COPI mutants. *J Cell Biol* 136, 789-802.5600
- Gaynor, E.C., te, H.S., Graham, T.R., Aebi, M., and Emr, S.D. (1994). Signal-mediated retrieval of a membrane protein from the Golgi to the ER in yeast. *J Cell Biol* 127, 653-665.5621
- Gedde-Dahl, M., Freisewinkel, I., Staschewski, M., Schenck, K., Koch, N., and Bakke, O. (1997). Exon 6 is essential for invariant chain trimerization and induction of large endosomal structures. *J Biol Chem* 272, 8281-8287.4589
- Geva, Y., and Schuldiner, M. (2014). The back and forth of cargo exit from the endoplasmic reticulum. *Curr Biol* 24, R130-R136.8339
- Ghosh, P., Amaya, M., Mellins, E., and Wiley, D.C. (1995). The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 378, 457-462.1725
- Gil-Yarom, N., Radomir, L., Sever, L., Kramer, M.P., Lewinsky, H., Bornstein, C., Blecher-Gonen, R., Barnett-Itzhaki, Z., Mirkin, V., Friedlander, G., *et al.* (2017). CD74 is a novel transcription regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 562-567.

- Giraud, C.G., and Maccioni, H.J. (2003). Endoplasmic reticulum export of glycosyltransferases depends on interaction of a cytoplasmic dibasic motif with Sar1. *Mol Biol Cell* **14**, 3753-3766.8330
- Girod, A., Storrie, B., Simpson, J.C., Johannes, L., Goud, B., Roberts, L.M., Lord, J.M., Nilsson, T., and Pepperkok, R. (1999). Evidence for a COP-I-independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol* **1**, 423-430.8280
- Go, N.F., Castle, B.E., Barrett, R., Kastelein, R., Dang, W., Mosmann, T.R., Moore, K.W., and Howard, M. (1990). Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J Exp Med* **172**, 1625-1631.
- Godde, N.J., D'Abaco, G.M., Paradiso, L., and Novak, U. (2006). Efficient ADAM22 surface expression is mediated by phosphorylation-dependent interaction with 14-3-3 protein family members. *J Cell Sci* **119**, 3296-3305.8350
- Gore, Y., Starlets, D., Maharshak, N., Becker-Herman, S., Kaneyuki, U., Leng, L., Bucala, R., and Shachar, I. (2008). Macrophage migration inhibitory factor induces B cell survival by activation of a CD74-CD44 receptor complex. *J Biol Chem* **283**, 2784-2792.6211
- Gotter, J., Brors, B., Hergenhausen, M., and Kyewski, B. (2004). Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. *J Exp Med* **199**, 155-166.
- Guncar, G., Pungercic, G., Klemencic, I., Turk, V., and Turk, D. (1999). Crystal structure of MHC class II-associated p41 li fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. *EMBO J* **18**, 793-803.4686
- Gunther, S., Schlundt, A., Sticht, J., Roske, Y., Heinemann, U., Wiesmuller, K.H., Jung, G., Falk, K., Rotzschke, O., and Freund, C. (2010). Bidirectional binding of invariant chain peptides to an MHC class II molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 22219-22224.
- Hake, S.B., Tobin, H.M., Steimle, V., and Denzin, L.K. (2003). Comparison of the transcriptional regulation of classical and non-classical MHC class II genes. *Eur J Immunol* **33**, 2361-2371.5410
- Harter, C., Pavel, J., Coccia, F., Draken, E., Wegehangel, S., Tschochner, H., and Wieland, F. (1996). Nonclathrin coat protein gamma, a subunit of coatamer, binds to the cytoplasmic dilysine motif of membrane proteins of the early secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1902-1906.8283
- Harter, C., and Wieland, F.T. (1998). A single binding site for dilysine retrieval motifs and p23 within the gamma subunit of coatamer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11649-11654.8284
- Hasdemir, B., Fitzgerald, D.J., Prior, I.A., Tepikin, A.V., and Burgoyne, R.D. (2005). Traffic of Kv4 K⁺ channels mediated by KChIP1 is via a novel post-ER vesicular pathway. *J Cell Biol* **171**, 459-469.8364
- Henderson, B.J., Srinivasan, R., Nichols, W.A., Dilworth, C.N., Gutierrez, D.F., Mackey, E.D., McKinney, S., Drenan, R.M., Richards, C.I., and Lester, H.A. (2014). Nicotine exploits a COPI-mediated process for chaperone-mediated up-regulation of its receptors. *J Gen Physiol* **143**, 51-66.
- Henne, C., Schwenk, F., Koch, N., and Möller, P. (1995). Surface expression of the invariant chain (CD74) is independent of concomitant expression of major histocompatibility complex class II antigens. *Immunology* **84**, 177-182.1218

- Heusser, K., Yuan, H., Neagoe, I., Tarasov, A.I., Ashcroft, F.M., and Schwappach, B. (2006). Scavenging of 14-3-3 proteins reveals their involvement in the cell-surface transport of ATP-sensitive K⁺ channels. *J Cell Sci* **119**, 4353-4363.6620
- Hinrichsen, L., Harborth, J., Andrees, L., Weber, K., and Ungewickell, E.J. (2003). Effect of clathrin heavy chain- and alpha-adaptin-specific small inhibitory RNAs on endocytic accessory proteins and receptor trafficking in HeLa cells. *J Biol Chem* **278**, 45160-45170.8271
- Hofmann, M.W., Honing, S., Rodionov, D., Dobberstein, B., von Figura, K., and Bakke, O. (1999). The leucine-based sorting motifs in the cytoplasmic domain of the invariant chain are recognized by the clathrin adaptors AP1 and AP2 and their medium chains. *J Biol Chem* **274**, 36153-36158.3439
- Hsing, L.C., and Rudensky, A.Y. (2005). The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev* **207**, 229-241.7794
- Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Iwashige, H., Aridome, K., Hokita, S., and Aikou, T. (2001). Invariant chain expression in gastric cancer. *Cancer Lett* **168**, 87-91.4908
- Itano, A.A., and Jenkins, M.K. (2003). Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nat Immunol* **4**, 733-739.8274
- Ito, Y., Ashenberg, O., Pyrdol, J., Luoma, A.M., Rozenblatt-Rosen, O., Hofree, M., Christian, E., Ferrari de Andrade, L., Tay, R.E., Teyton, L., *et al.* (2018). Rapid CLIP dissociation from MHC II promotes an unusual antigen presentation pathway in autoimmunity. *J Exp Med* **215**, 2617-2635.
- Jackson, M.R., Nilsson, T., and Peterson, P.A. (1990). Identification of a consensus motif for the retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* **9**, 3153-3162.1492
- Jackson, M.R., Nilsson, T., and Peterson, P.A. (1993). Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **121**, 317-333.4628
- Jasanoff, A., Song, S., Dinner, A.R., Wagner, G., and Wiley, D.C. (1999). One of two unstructured domains of Ii becomes ordered in complexes with MHC class II molecules. *Immunity* **10**, 761-768.4611
- Jasanoff, A., Wagner, G., and Wiley, D.C. (1998). Structure of a trimeric domain of the MHC class II-associated chaperonin and targeting protein Ii. *EMBO J* **17**, 6812-6818.4519
- Jensen, D., and Schekman, R. (2011). COPII-mediated vesicle formation at a glance. *J Cell Sci* **124**, 1-4.8329
- Jensen, P.E. (2007). Recent advances in antigen processing and presentation. *Nat Immunol* **8**, 1041-1048.8318
- Jiang, J., Natarajan, K., Boyd, L.F., Morozov, G.I., Mage, M.G., and Margulies, D.H. (2017). Crystal structure of a TAPBPR-MHC I complex reveals the mechanism of peptide editing in antigen presentation. *Science* **358**, 1064-1068.
- Jones, P.P., Murphy, D.B., and McDevitt, H.O. (1978). Two-gene control of the expression of a murine Ia antigen. *J Exp Med* **148**, 925-939.8153
- Karlsson, L., Surh, C.D., Sprent, J., and Peterson, P.A. (1991). A novel class II MHC molecule with unusual tissue distribution. *Nature* **351**, 485-488.535

- Khalil, H., Brunet, A., Saba, I., Terra, R., Sekaly, R.P., and Thibodeau, J. (2003). The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int Immunol* 15, 1249-1263.4627
- Khalil, H., Brunet, A., and Thibodeau, J. (2005). A three-amino-acid-long HLA-DRbeta cytoplasmic tail is sufficient to overcome ER retention of invariant-chain p35. *J Cell Sci* 118, 4679-4687.5431
- Kilisch, M., Lytovchenko, O., Arakel, E.C., Bertinetti, D., and Schwappach, B. (2016). A dual phosphorylation switch controls 14-3-3-dependent cell surface expression of TASK-1. *J Cell Sci* 129, 831-842.8352
- Klasen, C., Ziehm, T., Huber, M., Asare, Y., Kapurniotu, A., Shachar, I., Bernhagen, J., and El Bounkari, O. (2018). LPS-mediated cell surface expression of CD74 promotes the proliferation of B cells in response to MIF. *Cell Signal* 46, 32-42.
- Klein, L., Hinterberger, M., Wirnsberger, G., and Kyewski, B. (2009). Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 9, 833-844.8258
- Klein, O., Polack, G.W., Surti, T., Kegler-Ebo, D., Smith, S.O., and DiMaio, D. (1998). Role of glutamine 17 of the bovine papillomavirus E5 protein in platelet-derived growth factor beta receptor activation and cell transformation. *J Virol* 72, 8921-8932.
- Klumperman, J., Schweizer, A., Clausen, H., Tang, B.L., Hong, W., Oorschot, V., and Hauri, H.P. (1998). The recycling pathway of protein ERGIC-53 and dynamics of the ER-Golgi intermediate compartment. *J Cell Sci* 111 (Pt 22), 3411-3425.8336
- Kobayashi, K.S., and Van den Elsen, P.J. (2012). NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nat Rev Immunol* 12, 813-820.8247
- Koch, N., and Harris, A.W. (1984). Differential expression of the invariant chain in mouse tumor cells: relationship to B lymphoid development. *J Immunol* 132, 12-15.7000
- Koch, N., Zacharias, M., Konig, A., Temme, S., Neumann, J., and Springer, S. (2011). Stoichiometry of HLA class II-invariant chain oligomers. *PLoS ONE* 6, e17257.7898
- Korman, A.J., Boss, J.M., Spies, T., Sorrentino, K., Okada, K., and Strominger, J.L. (1985). Genetic complexity and expression of human class II histocompatibility antigens. *Immunol Rev* 85, 45-86.620
- Krawczyk, M., and Reith, W. (2006). Regulation of MHC class II expression, a unique regulatory system identified by the study of a primary immunodeficiency disease. *Tissue Antigens* 67, 183-197.8244
- Kropshofer, H., Hammerling, G.J., and Vogt, A.B. (1997). How HLA-DM edits the MHC class II peptide repertoire: Survival of the fittest? *Immunol Today* 18, 77-82.3059
- Kropshofer, H., Vogt, A.B., Moldenhauer, G., Hammer, J., Blum, J.S., and Hammerling, G.J. (1996). Editing of the HLA-DR-peptide repertoire by HLA-DM. *EMBO J* 15, 6144-6154.2868
- Kuwana, T., Peterson, P.A., and Karlsson, L. (1998). Exit of major histocompatibility complex class II-invariant chain p35 complexes from the endoplasmic reticulum is modulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1056-1061.3416
- Lala, P.K., Johnson, G.R., Battye, F.L., and Nossal, G.J. (1979). Maturation of B lymphocytes. I. Concurrent appearance of increasing Ig, Ia, and mitogen responsiveness. *J Immunol* 122, 334-341.

- Lamb, C.A., and Cresswell, P. (1992). Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes. *J Immunol* 148, 3478-3482.805
- Landmann, S., Muhlethaler-Mottet, A., Bernasconi, L., Suter, T., Waldburger, J.M., Masternak, K., Arrighi, J.F., Hauser, C., Fontana, A., and Reith, W. (2001). Maturation of dendritic cells is accompanied by rapid transcriptional silencing of class II transactivator (CIITA) expression. *J Exp Med* 194, 379-391.4431
- Landolt-Marticorena, C., Williams, K.A., Deber, C.M., and Reithmeier, R.A. (1993). Non-random distribution of amino acids in the transmembrane segments of human type I single span membrane proteins. *J Mol Biol* 229, 602-608.4591
- Landsverk, O.J., Bakke, O., and Gregers, T.F. (2009). MHC II and the endocytic pathway: regulation by invariant chain. *Scand J Immunol* 70, 184-193.7590
- Langerholc, T., Zavasnik-Bergant, V., Turk, B., Turk, V., Abrahamson, M., and Kos, J. (2005). Inhibitory properties of cystatin F and its localization in U937 promonocyte cells. *FEBS J* 272, 1535-1545.8232
- Lanzavecchia, A. (1990). Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 8, 773-793.
- Layet, C., and Germain, R.N. (1991). Invariant chain promotes egress of poorly expressed, haplotype-mismatched class II major histocompatibility complex A α B β dimers from the endoplasmic reticulum/cis-Golgi compartment. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 2364-2350.810
- Lazova, R., Moynes, R., May, D., and Scott, G. (1997). LN-2 (CD74). A marker to distinguish atypical fibroxanthoma from malignant fibrous histiocytoma. *Cancer* 79, 2115-2124.7342
- LeibundGut-Landmann, S., Waldburger, J.M., Krawczyk, M., Otten, L.A., Suter, T., Fontana, A., Acha-Orbea, H., and Reith, W. (2004). Mini-review: Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *Eur J Immunol* 34, 1513-1525.8246
- Lemberg, M.K., and Martoglio, B. (2004). On the mechanism of SPP-catalysed intramembrane proteolysis; conformational control of peptide bond hydrolysis in the plane of the membrane. *FEBS Lett* 564, 213-218.
- Leng, L., and Bucala, R. (2006). Insight into the biology of macrophage migration inhibitory factor (MIF) revealed by the cloning of its cell surface receptor. *Cell Res* 16, 162-168.8346
- Leng, L., Metz, C.N., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., Delohery, T., Chen, Y., Mitchell, R.A., and Bucala, R. (2003). MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* 197, 1467-1476.4900
- Letourneur, F., Gaynor, E.C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, S.D., Riezman, H., and Cosson, P. (1994). Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* 79, 1199-1207.5619
- Letourneur, F., and Klausner, R.D. (1992). A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* 69, 1143-1157.4570
- Levine, F., Erlich, H.A., Mach, B., and Pious, D. (1985). Transcriptional regulation of HLA class II and invariant chain genes. *J Immunol* 134, 637-640.
- Li, J.G., Chen, C., Huang, P., Wang, Y., and Liu-Chen, L.Y. (2012). 14-3-3zeta Protein regulates anterograde transport of the human kappa-opioid receptor (hKOPR). *J Biol Chem* 287, 37778-37792.8306

- Liljedahl, M., Kuwana, T., Fung-Leung, W.P., Jackson, M., Peterson, P.A., and Karlsson, L. (1996). HLA-DO is a lysosomal resident which requires association with HLA-DM for efficient intracellular transport. *EMBO J* **15**, 4817-4824.2621
- Liu, S.H., Marks, M.S., and Brodsky, F.M. (1998). A dominant-negative clathrin mutant differentially affects trafficking of molecules with distinct sorting motifs in the class II major histocompatibility complex (MHC) pathway. *J Cell Biol* **140**, 1023-1037.3359
- Lotteau, V., Teyton, L., Peleraux, A., Nilsson, T., Karlsson, L., Schmid, S.L., Quaranta, V., and Peterson, P.A. (1990). Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* **348**, 600-605.446
- Lue, H., Thiele, M., Franz, J., Dahl, E., Speckgens, S., Leng, L., Fingerle-Rowson, G., Bucala, R., Luscher, B., and Bernhagen, J. (2007). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity. *Oncogene* **26**, 5046-5059.6216
- Luskey, K.L., and Stevens, B. (1985). Human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Conserved domains responsible for catalytic activity and sterol-regulated degradation. *J Biol Chem* **260**, 10271-10277.8279
- Ma, D., Zerangue, N., Lin, Y.F., Collins, A., Yu, M., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2001). Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* **291**, 316-319.8293
- Mach, B., Steimle, V., Martinez-Soria, E., and Reith, W. (1996). Regulation of MHC class II genes: Lessons from a disease. *Annu Rev Immunol* **14**, 301-331.2036
- Machamer, C.E., and Cresswell, P. (1982). Biosynthesis and glycosylation of the invariant chain associated with HLA-DR antigens. *J Immunol* **129**, 2564-2569.3343
- MacKay, P.A., Leibundgut-Landmann, S., Koch, N., Dunn, A.C., Reith, W., Jack, R.W., and McLellan, A.D. (2006). Circulating, soluble forms of major histocompatibility complex antigens are not exosome-associated. *Eur J Immunol* **36**, 2875-2884.
- Maehr, R., Hang, H.C., Mintern, J.D., Kim, Y.M., Cuvillier, A., Nishimura, M., Yamada, K., Shirahama-Noda, K., Hara-Nishimura, I., and Ploegh, H.L. (2005). Asparagine endopeptidase is not essential for class II MHC antigen presentation but is required for processing of cathepsin L in mice. *J Immunol* **174**, 7066-7074.8218
- Maehr, R., Kraus, M., and Ploegh, H.L. (2004). Mice deficient in invariant-chain and MHC class II exhibit a normal mature B2 cell compartment. *Eur J Immunol* **34**, 2230-2236.4902
- Magister, S., Obermajer, N., Mirkovic, B., Svajger, U., Renko, M., Softic, A., Romih, R., Colbert, J.D., Watts, C., and Kos, J. (2012). Regulation of cathepsins S and L by cystatin F during maturation of dendritic cells. *Eur J Cell Biol* **91**, 391-401.8231
- Maharshak, N., Cohen, S., Lantner, F., Hart, G., Leng, L., Bucala, R., and Shachar, I. (2010). CD74 is a survival receptor on colon epithelial cells. *World J Gastroenterol* **16**, 3258-3266.8239
- Majera, D., Kristan, K.C., Neefjes, J., Turk, D., and Mihelic, M. (2012). Expression, purification and assembly of soluble multimeric MHC class II-invariant chain complexes. *FEBS Lett* **586**, 1318-1324.8165
- Mancias, J.D., and Goldberg, J. (2008). Structural basis of cargo membrane protein discrimination by the human COPII coat machinery. *EMBO J* **27**, 2918-2928.8326

- Manoury, B., Mazzeo, D., Li, D.N., Billson, J., Loak, K., Benaroch, P., and Watts, C. (2003). Asparagine endopeptidase can initiate the removal of the MHC class II invariant chain chaperone. *Immunity* 18, 489-498.8203
- Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2000). A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 27, 97-106.4578
- Maric, M.A., Taylor, M.D., and Blum, J.S. (1994). Endosomal aspartic proteinases are required for invariant-chain processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2171-2175.4385
- Marios-Frankiskos, S., Panagiota, M., Katerina, B., and Athanassakis, I. (2010). Serum-derived MHC class II molecules: potent regulators of the cellular and humoral immune response. *Immunobiology* 215, 194-205.
- Marks, M.S., Blum, J.S., and Cresswell, P. (1990). Invariant chain trimers are sequestered in the rough endoplasmic reticulum in the absence of association with HLA class II antigens. *J Cell Biol* 111, 839-855.4386
- Marks, M.S., Ohno, H., Kirchhausen, T., and Bonracino, J.S. (1997). Protein sorting by tyrosine-based signals: adapting to the Ys and wherefores. *Trends Cell Biol* 7, 124-128.8268
- Marks, M.S., Roche, P.A., van Donselaar, E., Woodruff, L., Peters, P.J., and Bonifacio, J.S. (1995). A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the β chain directs HLA-DM to MHC class II compartments. *J Cell Biol* 131, 351-369.3301
- Martinez-Menarguez, J.A., Geuze, H.J., Slot, J.W., and Klumperman, J. (1999). Vesicular tubular clusters between the ER and Golgi mediate concentration of soluble secretory proteins by exclusion from COPI-coated vesicles. *Cell* 98, 81-90.8375
- Martire, G., Mottola, G., Pascale, M.C., Malagolini, N., Turrini, I., Serafini-Cessi, F., Jackson, M.R., and Bonatti, S. (1996). Different fate of a single reporter protein containing KDEL or KKXX targeting signals stably expressed in mammalian cells. *J Biol Chem* 271, 3541-3547.8281
- Mathan, T.S., Figdor, C.G., and Buschow, S.I. (2013). Human plasmacytoid dendritic cells: from molecules to intercellular communication network. *Front Immunol* 4, 372.8315
- Matsuno, K., Ezaki, T., Kudo, S., and Uehara, Y. (1996). A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. *J Exp Med* 183, 1865-1878.
- Matza, D., Kerem, A., Medvedovsky, H., Lantner, F., and Shachar, I. (2002a). Invariant chain-induced B cell differentiation requires intramembrane proteolytic release of the cytosolic domain. *Immunity* 17, 549-560.4895
- Matza, D., Lantner, F., Bogoch, Y., Flaishon, L., Hershkovich, R., and Shachar, I. (2002b). Invariant chain induces B cell maturation in a process that is independent of its chaperonic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3018-3023.4896
- Matza, D., Wolstein, O., Dikstein, R., and Shachar, I. (2001). Invariant chain induces B cell maturation by activating a TAF(II)105-NF-kappaB-dependent transcription program. *J Biol Chem* 276, 27203-27206.4898
- Maubach, G., Lim, M.C., Kumar, S., and Zhuo, L. (2007). Expression and upregulation of cathepsin S and other early molecules required for antigen presentation in activated hepatic stellate cells upon IFN-gamma treatment. *Biochim Biophys Acta* 1773, 219-231.8220

- McCaughtry, T.M., Wilken, M.S., and Hogquist, K.A. (2007). Thymic emigration revisited. *J Exp Med* 204, 2513-2520.
- McCormick, P.J., Martina, J.A., and Bonifacio, J.S. (2005). Involvement of clathrin and AP-2 in the trafficking of MHC class II molecules to antigen-processing compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7910-7915.6336
- Mensali, N., Grenov, A., Pati, N.B., Dillard, P., Myhre, M.R., Gaudernack, G., Kvalheim, G., Inderberg, E.M., Bakke, O., and Walchli, S. (2019). Antigen-delivery through invariant chain (CD74) boosts CD8 and CD4 T cell immunity. *Oncoimmunology* 8, 1558663.
- Meyer-Siegler, K., and Hudson, P.B. (1996). Enhanced expression of macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma metastases. *Urology* 48, 448-452.8310
- Meyer-Siegler, K.L., Leifheit, E.C., and Vera, P.L. (2004). Inhibition of macrophage migration inhibitory factor decreases proliferation and cytokine expression in bladder cancer cells. *BMC Cancer* 4, 34.4901
- Meyer, G.A., and Radsak, K.D. (2000). Identification of a novel signal sequence that targets transmembrane proteins to the nuclear envelope inner membrane. *J Biol Chem* 275, 3857-3866.
- Meza-Romero, R., Benedek, G., Leng, L., Bucala, R., and Vandenbark, A.A. (2016). Predicted structure of MIF/CD74 and RTL1000/CD74 complexes. *Metab Brain Dis* 31, 249-255.8347
- Meza-Romero, R., Benedek, G., Yu, X., Mooney, J.L., Dahan, R., Duvshani, N., Bucala, R., Offner, H., Reiter, Y., Burrows, G.G., *et al.* (2014). HLA-DRA1 constructs block CD74 expression and MIF effects in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 192, 4164-4173.8323
- Michelsen, K., Schmid, V., Metz, J., Heusser, K., Liebel, U., Schwede, T., Spang, A., and Schwappach, B. (2007). Novel cargo-binding site in the beta and delta subunits of coatamer. *J Cell Biol* 179, 209-217.8287
- Michelsen, K., Yuan, H., and Schwappach, B. (2005). Hide and run. Arginine-based endoplasmic-reticulum-sorting motifs in the assembly of heteromultimeric membrane proteins. *EMBO Rep* 6, 717-722.7899
- Mihelic, M., Dobersek, A., Guncar, G., and Turk, D. (2008). Inhibitory fragment from the p41 form of invariant chain can regulate activity of cysteine cathepsins in antigen presentation. *J Biol Chem* 283, 14453-14460.8234
- Mizushima, N. (2005). The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1535-1541.
- Moldenhauer, G., Henne, C., Karhausen, J., and Moller, P. (1999). Surface-expressed invariant chain (CD74) is required for internalization of human leucocyte antigen-DR molecules to early endosomal compartments. *Immunology* 96, 473-484.8273
- Motley, A., Bright, N.A., Seaman, M.N., and Robinson, M.S. (2003). Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J Cell Biol* 162, 909-918.8270
- Mrowiec, T., and Schwappach, B. (2006). 14-3-3 proteins in membrane protein transport. *Biol Chem* 387, 1227-1236.6621
- Nag, B., Kendrick, T., Arimilli, S., Yu, S.C., and Sriram, S. (1996). Soluble MHC II-peptide complexes induce antigen-specific apoptosis in T cells. *Cell Immunol* 170, 25-33.

- Nakagawa, T., Roth, W., Wong, P., Nelson, A., Farr, A., Deussing, J., Villadangos, J.A., Ploegh, H., Peters, C., and Rudensky, A.Y. (1998). Cathepsin L: critical role in *Ii* degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* **280**, 450-453.7802
- Nakagawa, T.Y., Brissette, W.H., Lira, P.D., Griffiths, R.J., Petrushova, N., Stock, J., McNeish, J.D., Eastman, S.E., Howard, E.D., Clarke, S.R., *et al.* (1999). Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* **10**, 207-217.7801
- Nedjic, J., Aichinger, M., Mizushima, N., and Klein, L. (2009). Macroautophagy, endogenous MHC II loading and T cell selection: the benefits of breaking the rules. *Curr Opin Immunol* **21**, 92-97.7317
- Neefjes, J.J., and Ploegh, H.L. (1992). Inhibition of endosomal proteolytic activity by leupeptin blocks surface expression of MHC class II molecules and their conversion to SDS resistance $\alpha\beta$ heterodimers in endosomes. *EMBO J* **11**, 411-416.2119
- Neefjes, J.J., Stollorz, V., Peters, P.J., Geuze, H.J., and Ploegh, H.L. (1990). The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell* **61**, 171-183.8260
- Nesterov, A., Kurten, R.C., and Gill, G.N. (1995). Association of epidermal growth factor receptors with coated pit adaptins via a tyrosine phosphorylation-regulated mechanism. *J Biol Chem* **270**, 6320-6327.8272
- Neumann, J., and Koch, N. (2005). Assembly of major histocompatibility complex class II subunits with invariant chain. *FEBS Lett* **579**, 6055-6059.7911
- Neumann, J., and Koch, N. (2006). A novel domain on HLA-DR β chain regulates the chaperone role of the invariant chain. *J Cell Sci* **119**, 4207-4214.7910
- Neumann, J., Konig, A., and Koch, N. (2007). Detection of aberrant association of DM with MHC class II subunits in the absence of invariant chain. *Int Immunol* **19**, 31-39.7909
- Newcomb, J.R., Carboy-Newcomb, C., and Cresswell, P. (1996). Trimeric interactions of the invariant chain and its association with major histocompatibility complex class II $\alpha\beta$ dimers. *J Biol Chem* **271**, 24249-24256.3567
- Newcomb, J.R., and Cresswell, P. (1993). Structural analysis of proteolytic products of MHC class II-invariant chain complexes generated in vivo. *J Immunol* **151**, 4153-4163.3457
- Nguyen, Q.V., Knapp, W., and Humphreys, R.E. (1989). Inhibition by leupeptin and antipain of the intracellular proteolysis of *Ii*. *Hum Immunol* **24**, 153-163.8215
- Nguyen, T.B., Jayaraman, P., Bergseng, E., Madhusudhan, M.S., Kim, C.Y., and Sollid, L.M. (2017). Unraveling the structural basis for the unusually rich association of human leukocyte antigen DQ2.5 with class-II-associated invariant chain peptides. *J Biol Chem* **292**, 9218-9228.
- Nickel, W., and Rabouille, C. (2009). Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 148-155.8252
- Nimmerjahn, F., Milosevic, S., Behrends, U., Jaffee, E.M., Pardoll, D.M., Bornkamm, G.W., and Mautner, J. (2003). Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol* **33**, 1250-1259.7828
- Nishihira, J., Ishibashi, T., Fukushima, T., Sun, B., Sato, Y., and Todo, S. (2003). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): Its potential role in tumor growth and tumor-associated angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci* **995**, 171-182.8312

- Nishimura, N., Bannykh, S., Slabough, S., Matteson, J., Altschuler, Y., Hahn, K., and Balch, W.E. (1999). A di-acidic (DXE) code directs concentration of cargo during export from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 274, 15937-15946.8334
- Nordeng, T.W., Gregers, T.F., Kongsvik, T.L., Meresse, S., Gorvel, J.P., Jourdan, F., Motta, A., and Bakke, O. (2002). The cytoplasmic tail of invariant chain regulates endosome fusion and morphology. *Mol Biol Cell* 13, 1846-1856.4617
- Nufer, O., and Hauri, H.P. (2003). ER Export: Call 14-3-3. *Curr Biol* 13, R391-R393.4631
- O'Kelly, I., Butler, M.H., Zilberberg, N., and Goldstein, S.A. (2002). Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* 111, 577-588.4594
- O'Sullivan, D.M., Noonan, D., and Quaranta, V. (1987). Four Ia invariant chain forms derive from a single gene by alternative splicing and alternate initiation of transcription/translation. *J Exp Med* 166, 444-450.1670
- Obsilova, V., Kopecka, M., Kosek, D., Kacirova, M., Kylarova, S., Rezabkova, L., and Obsil, T. (2014). Mechanisms of the 14-3-3 protein function: regulation of protein function through conformational modulation. *Physiol Res* 63 Suppl 1, S155-S164.8344
- Ogrinc, T., Dolenc, I., Ritonja, A., and Turk, V. (1993). Purification of the complex of cathepsin L and the MHC class II-associated invariant chain fragment from human kidney. *FEBS Lett* 336, 555-559.4689
- Okamoto, Y., and Shikano, S. (2011). Phosphorylation-dependent C-terminal binding of 14-3-3 proteins promotes cell surface expression of HIV co-receptor GPR15. *J Biol Chem* 286, 7171-7181.8295
- Oliveira, C.C., and van Hall, T. (2013). Importance of TAP-independent processing pathways. *Mol Immunol* 55, 113-116.8257
- Ong, G.L., Goldenberg, D.M., Hansen, H.J., and Mattes, M.J. (1999). Cell surface expression and metabolism of major histocompatibility complex class II invariant chain (CD74) by diverse cell lines. *Immunology* 98, 296-302.4883
- Pai, R.K., Askew, D., Boom, W.H., and Harding, C.V. (2002). Regulation of class II MHC expression in APCs: roles of types I, III, and IV class II transactivator. *J Immunol* 169, 1326-1333.
- Palmer, J.T., Rasnick, D., Klaus, J.L., and Bromme, D. (1995). Vinyl sulfones as mechanism-based cysteine protease inhibitors. *J Med Chem* 38, 3193-3196.8228
- Paludan, C., Schmid, D., Landthaler, M., Vockerodt, M., Kube, D., Tuschl, T., and Munz, C. (2005). Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* 307, 593-596.7819
- Pamer, E., and Cresswell, P. (1998). Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 16, 323-358.3980
- Parham, P. (2018). Molecular definition of the transplantation antigens. *FEBS J* 285, 2728-2745.
- Park, S.J., Sadegh-Nasseri, S., and Wiley, D.C. (1995). Invariant chain made in *Escherichia coli* has an exposed N- terminal segment that blocks antigen binding to HLA-DR1 and a trimeric C-terminal segment that binds empty HLA-DR1. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 11289-11293.1728

- Pelham, H.R. (1995). Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Current Opinion in Cell Biology* 7, 530-535.3304
- Pepperkok, R., Scheel, J., Horstmann, H., Hauri, H.P., Griffiths, G., and Kreis, T.E. (1993). Beta-COP is essential for biosynthetic membrane transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex in vivo. *Cell* 74, 71-82.8372
- Perez, L., McLetchie, S., Gardiner, G.J., Deffit, S.N., Zhou, D., and Blum, J.S. (2016). LAMP-2C Inhibits MHC Class II Presentation of Cytoplasmic Antigens by Disrupting Chaperone-Mediated Autophagy. *J Immunol* 196, 2457-2465.
- Pessara, U., and Koch, N. (1990). Tumor necrosis factor alpha regulates expression of the major histocompatibility complex class II-associated invariant chain by binding of an NF-kappa B-like factor to a promoter element. *Mol Cell Biol* 10, 4146-4154.7329
- Peter, F., Plutner, H., Zhu, H., Kreis, T.E., and Balch, W.E. (1993). Beta-COP is essential for transport of protein from the endoplasmic reticulum to the Golgi in vitro. *J Cell Biol* 122, 1155-1167.8371
- Peters, C., Braun, M., Weber, B., Wendland, M., Schmidt, B., Pohlmann, R., Waheed, A., and von, F.K. (1990). Targeting of a lysosomal membrane protein: a tyrosine-containing endocytosis signal in the cytoplasmic tail of lysosomal acid phosphatase is necessary and sufficient for targeting to lysosomes. *EMBO J* 9, 3497-3506.8266
- Peters, P.J., Neefjes, J.J., Oorschot, V., Ploegh, H.L., and Geuze, H.J. (1991). Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* 349, 669-676.542
- Peters, P.J., Raposo, G., Neefjes, J.J., Oorschot, V., Leijendekker, R.L., Geuze, H.J., and Ploegh, H.L. (1995). Major histocompatibility complex class II compartments in human B lymphoblastoid cells are distinct from early endosomes. *J Exp Med* 182, 325-334.1576
- Pierre, P., and Mellman, I. (1998). Developmental regulation of invariant chain proteolysis controls MHC class II trafficking in mouse dendritic cells. *Cell* 93, 1135-1145.3975
- Pierre, P., Turley, S.J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R.M., and Mellman, I. (1997). Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388, 787-792.4276
- Pieters, J., Bakke, O., and Dobberstein, B. (1993). The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J Cell Sci* 106, 831-846.3360
- Pieters, J., Horstmann, H., Bakke, O., Griffiths, G., and Lipp, J. (1991). Intracellular transport and localization of major histocompatibility complex class II molecules and associated invariant chain. *J Cell Biol* 115, 1213-1223.4559
- Piskurich, J.F., Lin, K.I., Lin, Y., Wang, Y., Ting, J.P., and Calame, K. (2000). BLIMP-1 mediates extinction of major histocompatibility complex class II transactivator expression in plasma cells. *Nat Immunol* 1, 526-532.
- Pond, L., Kuhn, L.A., Teyton, L., Schutze, M.P., Tainer, J.A., Jackson, M.R., and Peterson, P.A. (1995). A role for acidic residues in di-leucine motif-based targeting to the endocytic pathway. *J Biol Chem* 270, 19989-19997.8267

- Ponzoni, M., Guarnaccia, F., Corrias, M.V., and Cornaglia-Ferraris, P. (1993). Uncoordinate induction and differential regulation of HLA class-I and class-II expression by gamma-interferon in differentiating human neuroblastoma cells. *Int J Cancer* 55, 817-823.3242
- Pozuelo, R.M., Geraghty, K.M., Wong, B.H., Wood, N.T., Campbell, D.G., Morrice, N., and Mackintosh, C. (2004). 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation and trafficking. *Biochem J* 379, 395-408.8302
- Presley, J.F., Cole, N.B., Schroer, T.A., Hirschberg, K., Zaal, K.J., and Lippincott-Schwartz, J. (1997). ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Nature* 389, 81-85.8361
- Reidy, T., Rittenberg, A., Dwyer, M., D'Ortona, S., Pier, G., and Gadjeva, M. (2013). Homotrimeric macrophage migration inhibitory factor (MIF) drives inflammatory responses in the corneal epithelium by promoting caveolin-rich platform assembly in response to infection. *J Biol Chem* 288, 8269-8278.
- Reith, W., LeibundGut-Landmann, S., and Waldburger, J.M. (2005). Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat Rev Immunol* 5, 793-806.8245
- Riberdy, J.M., and Cresswell, P. (1992). The antigen-processing mutant T2 suggest a role for MHC-linked genes in class II antigen presentation. *J Immunol* 148, 2586-2590.471
- Riese, R.J., Mitchell, R.N., Villadangos, J.A., Shi, G.P., Palmer, J.T., Karp, E.R., De Sanctis, G.T., Ploegh, H.L., and Chapman, H.A. (1998). Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *J Clin Invest* 101, 2351-2363.8221
- Riese, R.J., Wolf, P.R., Bromme, D., Natkin, L.R., Villadangos, J.A., Ploegh, H.L., and Chapman, H.A. (1996). Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 4, 357-366.2535
- Roche, P.A., Marks, M.S., and Cresswell, P. (1991a). Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 354, 392-394.4582
- Roche, P.A., Marks, M.S., and Cresswell, P. (1991b). Identification of the HLA class II-invariant chain complex as a nine subunit transmembrane glycoprotein. *Nature* 354, 392-394.804
- Roche, P.A., Teletski, C.L., Stang, E., Bakke, O., and Long, E.O. (1993). Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 8581-8585.303
- Rodionov, D.G., and Bakke, O. (1998). Medium chains of adaptor complexes AP-1 and AP-2 recognize leucine-based sorting signals from the invariant chain. *J Biol Chem* 273, 6005-6008.3463
- Romagnoli, P., and Germain, R.N. (1994). The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy. *J Exp Med* 180, 1107-1113.963
- Romagnoli, P., and Germain, R.N. (1995). Inhibition of invariant chain (Ii)-calnexin interaction results in enhanced degradation of Ii but does not prevent the assembly of $\alpha\beta$ Ii complexes. *J Exp Med* 182, 2027-2036.1752
- Ruckrich, T., Brandenburg, J., Cansier, A., Muller, M., Stevanovic, S., Schilling, K., Wiederanders, B., Beck, A., Melms, A., Reich, M., *et al.* (2006). Specificity of human

- cathepsin S determined by processing of peptide substrates and MHC class II-associated invariant chain. *Biol Chem* **387**, 1503-1511.8223
- Sadegh-Nasseri, S., Stern, L.J., Wiley, D.C., and Germain, R.N. (1994). MHC class II function preserved by low-affinity peptide interactions preceding stable binding. *Nature* **370**, 647-650.960
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* **182**, 389-400.2152
- Sand, K.M., Landsverk, O.J., Berg-Larsen, A., Bakke, O., and Gregers, T.F. (2014). The human-specific invariant chain isoform Iip35 modulates Iip33 trafficking and function. *Immunol Cell Biol* **92**, 791-798.
- Sanderson, F., Kleijmeer, M.J., Kelly, A., Verwoerd, D., Tulp, A., Neefjes, J.J., Geuze, H.J., and Trowsdale, J. (1994). Accumulation of HLA-DM, a regulator of antigen presentation, in MHC class II compartments. *Science* **266**, 1566-1569.1100
- Sant, A.J., Cullen, S.E., and Schwartz, B.D. (1985). Biosynthetic relationships of the chondroitin sulfate proteoglycan with Ia and invariant chain glycoproteins. *J Immunol* **135**, 416-422.4906
- Sato, K., and Nakano, A. (2002). Emp47p and its close homolog Emp46p have a tyrosine-containing endoplasmic reticulum exit signal and function in glycoprotein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **13**, 2518-2532.8340
- Sato, K., and Nakano, A. (2003). Oligomerization of a cargo receptor directs protein sorting into COPII-coated transport vesicles. *Mol Biol Cell* **14**, 3055-3063.8333
- Saudrais, C., Spehner, D., De la Salle, H., Bohbot, A., Cazenave, J.P., Goud, B., Hanau, D., and Salamero, J. (1998). Intracellular pathway for the generation of functional MHC class II peptide complexes in immature human dendritic cells. *J Immunol* **160**, 2597-2607.8345
- Scales, S.J., Pepperkok, R., and Kreis, T.E. (1997). Visualization of ER-to-Golgi transport in living cells reveals a sequential mode of action for COPII and COPI. *Cell* **90**, 1137-1148.8362
- Schmid, D., Pypaert, M., and Munz, C. (2007). Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* **26**, 79-92.7825
- Schneppenheim, J., Dressel, R., Huttli, S., Lullmann-Rauch, R., Engelke, M., Dittmann, K., Wienands, J., Eskelinen, E.L., Hermans-Borgmeyer, I., Fluhrer, R., *et al.* (2013). The intramembrane protease SPPL2a promotes B cell development and controls endosomal traffic by cleavage of the invariant chain. *J Exp Med* **210**, 41-58.8236
- Schneppenheim, J., Looock, A.C., Huttli, S., Schweizer, M., Lullmann-Rauch, R., Oberg, H.H., Arnold, P., Lehmann, C.H.K., Dudziak, D., Kabelitz, D., *et al.* (2017). The Influence of MHC Class II on B Cell Defects Induced by Invariant Chain/CD74 N-Terminal Fragments. *J Immunol* **199**, 172-185.
- Schuler, G., and Steinman, R.M. (1985). Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J Exp Med* **161**, 526-546.8229

- Schutze, M.-P., Peterson, P.A., and Jackson, M.R. (1994). An N-terminal double-arginine motif maintains type II membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* **13**, 1696-1705.734
- Schwartz, V., Kruttgen, A., Weis, J., Weber, C., Ostendorf, T., Lue, H., and Bernhagen, J. (2012). Role for CD74 and CXCR4 in clathrin-dependent endocytosis of the cytokine MIF. *Eur J Cell Biol* **91**, 435-449.8240
- Schwartz, V., Lue, H., Kraemer, S., Korbiel, J., Krohn, R., Ohl, K., Bucala, R., Weber, C., and Bernhagen, J. (2009). A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. *FEBS Lett* **583**, 2749-2757.8238
- Scott, D.B., Blanpied, T.A., and Ehlers, M.D. (2003). Coordinated PKA and PKC phosphorylation suppresses RXR-mediated ER retention and regulates the surface delivery of NMDA receptors. *Neuropharmacology* **45**, 755-767.8289
- Scott, D.B., Blanpied, T.A., Swanson, G.T., Zhang, C., and Ehlers, M.D. (2001). An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing. *J Neurosci* **21**, 3063-3072.4590
- Sekaly, R.-P., Tonnelie, C., Strubin, M., Mach, B., and Long, E.O. (1986). Cell surface expression of class II histocompatibility antigens occurs in the absence of the invariant chain. *J Exp Med* **164**, 1490-1504.792
- Servenius, B., Rask, L., and Peterson, P.A. (1987). Class II genes of the human major histocompatibility complex. The DO β gene is a divergent member of the class II β gene family. *J Biol Chem* **262**, 8759-8766.3239
- Sesso, A., de Faria, F.P., Iwamura, E.S., and Correa, H. (1994). A three-dimensional reconstruction study of the rough ER-Golgi interface in serial thin sections of the pancreatic acinar cell of the rat. *J Cell Sci* **107** (Pt 3), 517-528.
- Sette, A., Southwood, S., Miller, J., and Appella, E. (1995). Binding of major histocompatibility complex class II to the invariant chain-derived peptide, CLIP, is regulated by allelic polymorphism in class II. *J Exp Med* **181**, 677-683.1159
- Sevilla, L.M., Comstock, S.S., Swier, K., and Miller, J. (2004). Endoplasmic reticulum-associated degradation-induced dissociation of class II invariant chain complexes containing a glycosylation-deficient form of p41. *J Immunol* **173**, 2586-2593.8261
- Shachar, I., and Flavell, R.A. (1996). Requirement for invariant chain in B cell maturation and function. *Science* **274**, 106-108.2620
- Sherman, M.A., Weber, D.A., and Jensen, P.E. (1995). DM enhances peptide binding to class II MHC by release of invariant chain-derived peptide. *Immunity* **3**, 197-205.1730
- Shi, G.P., Bryant, R.A., Riese, R., Verhelst, S., Driessen, C., Li, Z., Bromme, D., Ploegh, H.L., and Chapman, H.A. (2000). Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages. *J Exp Med* **191**, 1177-1186.8214
- Shi, G.P., Villadangos, J.A., Dranoff, G., Small, C., Gu, L., Haley, K.J., Riese, R., Ploegh, H.L., and Chapman, H.A. (1999). Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* **10**, 197-206.8213

- Shi, X., Leng, L., Wang, T., Wang, W., Du, X., Li, J., McDonald, C., Chen, Z., Murphy, J.W., Lolis, E., *et al.* (2006). CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* 25, 595-606.6267
- Shikano, S., Coblitz, B., Sun, H., and Li, M. (2005). Genetic isolation of transport signals directing cell surface expression. *Nat Cell Biol* 7, 985-992.8297
- Shikano, S., Coblitz, B., Wu, M., and Li, M. (2006). 14-3-3 proteins: regulation of endoplasmic reticulum localization and surface expression of membrane proteins. *Trends Cell Biol* 16, 370-375.8301
- Shikano, S., and Li, M. (2003). Membrane receptor trafficking: evidence of proximal and distal zones conferred by two independent endoplasmic reticulum localization signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5783-5788.4642
- Shin, J.S., Ebersold, M., Pypaert, M., Delamarre, L., Hartley, A., and Mellman, I. (2006). Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature* 444, 115-118.5946
- Shinkai, Y., Koyasu, S., Nakayama, K., Murphy, K.M., Loh, D.Y., Reinherz, E.L., and Alt, F.W. (1993). Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes. *Science* 259, 822-825.
- Shishido, T., Kohyama, M., Nakai, W., Matsumoto, M., Miyata, H., Suenaga, T., and Arase, H. (2019). Invariant chain p41 mediates production of soluble MHC class II molecules. *Biochem Biophys Res Commun* 509, 216-221.
- Siebenkotten, I.M., Carstens, C., and Koch, N. (1998). Identification of a sequence that mediates promiscuous binding of invariant chain to MHC class II allotypes. *J Immunol* 160, 3355-3362.7921
- Siemasko, K., Eisfelder, B.J., Williamson, E., Kabak, S., and Clark, M.R. (1998). Signals from the B lymphocyte antigen receptor regulate MHC class II containing late endosomes. *J Immunol* 160, 5203-5208.4298
- Singer, P.A., Lauer, W., Dembic, Z., Mayer, W.E., Lipp, J., Koch, N., Hammerling, G., Klein, J., and Dobberstein, B. (1984). Structure of the murine Ia-associated invariant (Ii) chain as deduced from a cDNA clone. *EMBO J* 3, 873-877.7844
- Sloan, V.S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E., and Zaller, D.M. (1995). Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA- DR. *Nature* 375, 802-806.1478
- Smith, A.J., Daut, J., and Schwappach, B. (2011). Membrane proteins as 14-3-3 clients in functional regulation and intracellular transport. *Physiology (Bethesda)* 26, 181-191.8343
- Springer, S., Malkus, P., Borchert, B., Wellbrock, U., Duden, R., and Schekman, R. (2014). Regulated oligomerization induces uptake of a membrane protein into COPII vesicles independent of its cytosolic tail. *Traffic* 15, 531-545.8335
- Standley, S., Roche, K.W., McCallum, J., Sans, N., and Wenthold, R.J. (2000). PDZ domain suppression of an ER retention signal in NMDA receptor NR1 splice variants. *Neuron* 28, 887-898.4580
- Stinchcombe, J.C., Nomoto, H., Cutler, D.F., and Hopkins, C.R. (1995). Anterograde and retrograde traffic between the rough endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *J Cell Biol* 131, 1387-1401.

- Stoddart, A., Dykstra, M.L., Brown, B.K., Song, W., Pierce, S.K., and Brodsky, F.M. (2002). Lipid rafts unite signaling cascades with clathrin to regulate BCR internalization. *Immunity* 17, 451-462.8275
- Storrie, B., and Nilsson, T. (2002). The Golgi apparatus: balancing new with old. *Traffic* 3, 521-529.8325
- Storrie, B., Pepperkok, R., and Nilsson, T. (2000). Breaking the COPI monopoly on Golgi recycling. *Trends Cell Biol* 10, 385-391.8288
- Strawbridge, A.B., and Blum, J.S. (2007). Autophagy in MHC class II antigen processing. *Curr Opin Immunol* 19, 87-92.6853
- Strubin, M., Berte, C., and Mach, B. (1986). Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *EMBO J* 5, 3485-3488.867
- Strubin, M., Mach, B., and Long, E.O. (1984). The complete sequence of the mRNA for the HLA-DR-associated invariant chain reveals a polypeptide with an unusual transmembrane polarity. *EMBO J* 3, 869-872.4070
- Stumptner, P., and Benaroch, P. (1997). Interaction of MHC class II molecules with the invariant chain: role of the invariant chain (81-90) region. *EMBO J* 16, 5807-5818.3418
- Sun, H.W., Swope, M., Cinquina, C., Bedarkar, S., Bernhagen, J., Bucala, R., and Lolis, E. (1996). The subunit structure of human macrophage migration inhibitory factor: evidence for a trimer. *Protein Eng* 9, 631-635.6251
- Swift, A.M., and Machamer, C.E. (1991). A Golgi retention signal in a membrane-spanning domain of coronavirus E1 protein. *J Cell Biol* 115, 19-30.
- Szul, T., and Sztul, E. (2011). COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface. *Physiology (Bethesda)* 26, 348-364.8328
- Takahama, Y., Suzuki, H., Katz, K.S., Grusby, M.J., and Singer, A. (1994). Positive selection of CD4⁺ T cells by TCR ligation without aggregation even in the absence of MHC. *Nature* 371, 67-70.
- Teasdale, R.D., and Jackson, M.R. (1996). Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 27-54.4581
- Thayer, W.P., Ignatowicz, L., Weber, D.A., and Jensen, P.E. (1999). Class II-associated invariant chain peptide-independent binding of invariant chain to class II MHC molecules. *J Immunol* 162, 1502-1509.3454
- Thibodeau, J., Bourgeois-Daigneault, M.C., Huppe, G., Tremblay, J., Aumont, A., Houde, M., Bartee, E., Brunet, A., Gauvreau, M.E., De, G.A., *et al.* (2008). Interleukin-10-induced MARCH1 mediates intracellular sequestration of MHC class II in monocytes. *Eur J Immunol* 38, 1225-1230.6558
- Tingley, W.G., Ehlers, M.D., Kameyama, K., Doherty, C., Ptak, J.B., Riley, C.T., and Haganir, R.L. (1997). Characterization of protein kinase A and protein kinase C phosphorylation of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit using phosphorylation site-specific antibodies. *J Biol Chem* 272, 5157-5166.8300

- Tingley, W.G., Roche, K.W., Thompson, A.K., and Huganir, R.L. (1993). Regulation of NMDA receptor phosphorylation by alternative splicing of the C-terminal domain. *Nature* 364, 70-73.8298
- Tolosa, E., Li, W., Yasuda, Y., Wienhold, W., Denzin, L.K., Lautwein, A., Driessen, C., Schnorrer, P., Weber, E., Stevanovic, S., *et al.* (2003). Cathepsin V is involved in the degradation of invariant chain in human thymus and is overexpressed in myasthenia gravis. *J Clin Invest* 112, 517-526.5411
- Tonnelle, C., DeMars, R., and Long, E.O. (1985). DO β : a new β chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO J* 4, 2839-2847.165
- Trombetta, E.S., and Mellman, I. (2005). Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 23, 975-1028.6385
- Trowsdale, J., and Kelly, A. (1985). The human HLA class II alpha chain DZ alpha is distinct from genes in the DP, DQ and DR subregions. *EMBO J* 4, 2231-2237.3305
- Urban, S., and Freeman, M. (2002). Intramembrane proteolysis controls diverse signalling pathways throughout evolution. *Curr Opin Genet Dev* 12, 512-518.
- Van Ham, S.M., Tjin, E.P.M., Lillemeier, B.F., Gruneberg, U., Van Meijgaarden, K.E., Pastoors, L., Verwoerd, D., Tulp, A., Canas, B., Rahman, D., *et al.* (1997). HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading. *Curr Biol* 7, 950-957.3935
- van Heusden, G.P. (2005). 14-3-3 proteins: regulators of numerous eukaryotic proteins. *IUBMB Life* 57, 623-629.8296
- van Niel, G., Wubbolts, R., Ten, B.T., Buschow, S.I., Ossendorp, F.A., Melief, C.J., Raposo, G., van Balkom, B.W., and Stoorvogel, W. (2006). Dendritic cells regulate exposure of MHC class II at their plasma membrane by oligoubiquitination. *Immunity* 25, 885-894.5947
- Veenstra, H., Jacobs, P., and Dowdle, E.B. (1993). Processing of HLA-class II invariant chain and expression of the p35 form is different in malignant and transformed cells. *Blood* 82, 2494-2500.4353
- Veenstra, H., Jacobs, P., and Dowdle, E.B. (1996). Abnormal association between invariant chain and HLA class II alpha and beta chains in chronic lymphocytic leukemia. *Cell Immunol* 171, 68-73.4352
- Villadangos, J.A., and Ploegh, H.L. (2000). Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? *Immunity* 12, 233-239.4516
- Villadangos, J.A., Riese, R.J., Peters, C., Chapman, H.A., and Ploegh, H.L. (1997). Degradation of mouse invariant chain: roles of cathepsins S and D and the influence of major histocompatibility complex polymorphism. *J Exp Med* 186, 549-560.3459
- Viola, A., and Lanzavecchia, A. (1996). T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 273, 104-106.2171
- Vogt, A.B., Stern, L.J., Amshoff, C., Dobberstein, B., Hammerling, G.J., and Kropshofer, H. (1995). Interference of distinct invariant chain regions with superantigen contact area and antigenic peptide binding groove of HLA-DR. *J Immunol* 155, 4757-4765.2377
- Vyas, J.M., Van der Veen, A.G., and Ploegh, H.L. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nat Rev Immunol* 8, 607-618.8319

- Walseng, E., Bakke, O., and Roche, P.A. (2008). Major histocompatibility complex class II-peptide complexes internalize using a clathrin- and dynamin-independent endocytosis pathway. *J Biol Chem* 283, 14717-14727.6525
- Wang, K., Peterson, P.A., and Karlsson, L. (1997). Decreased endosomal delivery of major histocompatibility complex class II-invariant chain complexes in dynamin-deficient cells. *J Biol Chem* 272, 17055-17060.3508
- Warmerdam, P.A., Long, E.O., and Roche, P.A. (1996). Isoforms of the invariant chain regulate transport of MHC class II molecules to antigen processing compartments. *J Cell Biol* 133, 281-291.2212
- Watson, P., and Stephens, D.J. (2005). ER-to-Golgi transport: form and formation of vesicular and tubular carriers. *Biochim Biophys Acta* 1744, 304-315.8366
- Watts, C. (1997). Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 15, 821-850.3310
- Watts, C., Matthews, S.P., Mazzeo, D., Manoury, B., and Moss, C.X. (2005). Asparaginyl endopeptidase: case history of a class II MHC compartment protease. *Immunol Rev* 207, 218-228.8199
- Weber, D.A., Evavold, B.D., and Jensen, P.E. (1996). Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM. *Science* 274, 618-620.2669
- Weihofen, A., and Martoglio, B. (2003). Intramembrane-cleaving proteases: controlled liberation of proteins and bioactive peptides. *Trends Cell Biol* 13, 71-78.
- Weisz, O.A., Swift, A.M., and Machamer, C.E. (1993). Oligomerization of a membrane protein correlates with its retention in the Golgi complex. *J Cell Biol* 122, 1185-1196.
- White, J., Johannes, L., Mallard, F., Girod, A., Grill, S., Reinsch, S., Keller, P., Tzschaschel, B., Echard, A., Goud, B., *et al.* (1999). Rab6 coordinates a novel Golgi to ER retrograde transport pathway in live cells. *J Cell Biol* 147, 743-760.8324
- Williams, M.A., and Fukuda, M. (1990). Accumulation of membrane glycoproteins in lysosomes requires a tyrosine residue at a particular position in the cytoplasmic tail. *J Cell Biol* 111, 955-966.8265
- Wilson, N.A., Wolf, P., Ploegh, H., Ignatowicz, L., Kappler, J., and Marrack, P. (1998). Invariant chain can bind MHC class II at a site other than the peptide binding groove. *J Immunol* 161, 4777-4784.8254
- Wu, G. (2013). Identification of endoplasmic reticulum export motifs for G protein-coupled receptors. *Methods Enzymol* 521, 189-202.8327
- Wu, X., Kong, X., Luchsinger, L., Smith, B.D., and Xu, Y. (2009). Regulating the activity of class II transactivator by posttranslational modifications: exploring the possibilities. *Mol Cell Biol* 29, 5639-5644.8248
- Xie, L., Qiao, X., Wu, Y., and Tang, J. (2011). beta-Arrestin1 mediates the endocytosis and functions of macrophage migration inhibitory factor. *PLoS ONE* 6, e16428.8241
- Yamashita, Y., Anczurowski, M., Nakatsugawa, M., Tanaka, M., Kagoya, Y., Sinha, A., Chamoto, K., Ochi, T., Guo, T., Saso, K., *et al.* (2017). HLA-DP(84Gly) constitutively presents endogenous peptides generated by the class I antigen processing pathway. *Nat Commun* 8, 15244.

- Yan, G., Shi, L., Penforis, A., and Faustman, D.L. (2003). Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells. *J Immunol* 170, 620-627.4618
- Yang, W., Zheng, C., Song, Q., Yang, X., Qiu, S., Liu, C., Chen, Z., Duan, S., and Luo, J. (2007). A three amino acid tail following the TM4 region of the N-methyl-D-aspartate receptor (NR) 2 subunits is sufficient to overcome endoplasmic reticulum retention of NR1-1a subunit. *J Biol Chem* 282, 9269-9278.6618
- Yorimitsu, T., and Klionsky, D.J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1542-1552.
- Young, L.J., Wilson, N.S., Schnorrer, P., Proietto, A., Ten, B.T., Matsuki, Y., Mount, A.M., Belz, G.T., O'Keefe, M., Ohmura-Hoshino, M., *et al.* (2008). Differential MHC class II synthesis and ubiquitination confers distinct antigen-presenting properties on conventional and plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol* 9, 1244-1252.7415
- Yuan, H., Michelsen, K., and Schwappach, B. (2003). 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr Biol* 13, 638-646.4640
- Zerangue, N., Malan, M.J., Fried, S.R., Dazin, P.F., Jan, Y.N., Jan, L.Y., and Schwappach, B. (2001). Analysis of endoplasmic reticulum trafficking signals by combinatorial screening in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2431-2436.4915
- Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1999). A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* 22, 537-548.4577
- Zhang, Z.N., Li, Q., Liu, C., Wang, H.B., Wang, Q., and Bao, L. (2008). The voltage-gated Na⁺ channel Nav1.8 contains an ER-retention/retrieval signal antagonized by the beta3 subunit. *J Cell Sci* 121, 3243-3252.8294
- Zhong, G.M., Castellino, F., Romagnoli, P., and Germain, R.N. (1996). Evidence that binding site occupancy is necessary and sufficient for effective major histocompatibility complex (MHC) class II transport through the secretory pathway redefines the primary function of class II-associated invariant chain peptides (CLIP). *J Exp Med* 184, 2061-2066.2758
- Zhou, D., and Blum, J.S. (2004). Presentation of cytosolic antigens via MHC class II molecules. *Immunol Res* 30, 279-290.
- Zhou, D., Li, P., Lin, Y., Lott, J.M., Hislop, A.D., Canaday, D.H., Brutkiewicz, R.R., and Blum, J.S. (2005). Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity* 22, 571-581.
- Zimmermann, V.S., Rovere, P., Trucy, J., Serre, K., Machy, P., Forquet, F., Leserman, L., and Davoust, J. (1999). Engagement of B cell receptor regulates the invariant chain-dependent MHC class II presentation pathway. *J Immunol* 162, 2495-2502.8237
- Zuber, C., Cormier, J.H., Guhl, B., Santimaria, R., Hebert, D.N., and Roth, J. (2007). EDEM1 reveals a quality control vesicular transport pathway out of the endoplasmic reticulum not involving the COPII exit sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4407-4412.8369
- Zuzarte, M., Heusser, K., Renigunta, V., Schlichthorl, G., Rinne, S., Wischmeyer, E., Daut, J., Schwappach, B., and Preisig-Muller, R. (2009). Intracellular traffic of the K⁺ channels TASK-1 and TASK-3: role of N- and C-terminal sorting signals and interaction with 14-3-3 proteins. *J Physiol* 587, 929-952.8305

Annexe

Annexe 1: Trafic des complexes li-CMHII formés autour des isoformes p33 et p35 - Résultats préliminaires non-publiés.

Annexe 2: Transport antérograde des complexes li-CMHII formés autour du mutant p35_{LIMLS8D} - Résultats préliminaires non-publiés.

Annexe 3: article de revue sur le rôle de la chaîne invariante dans l'édition du peptidome des molécules de classe II.

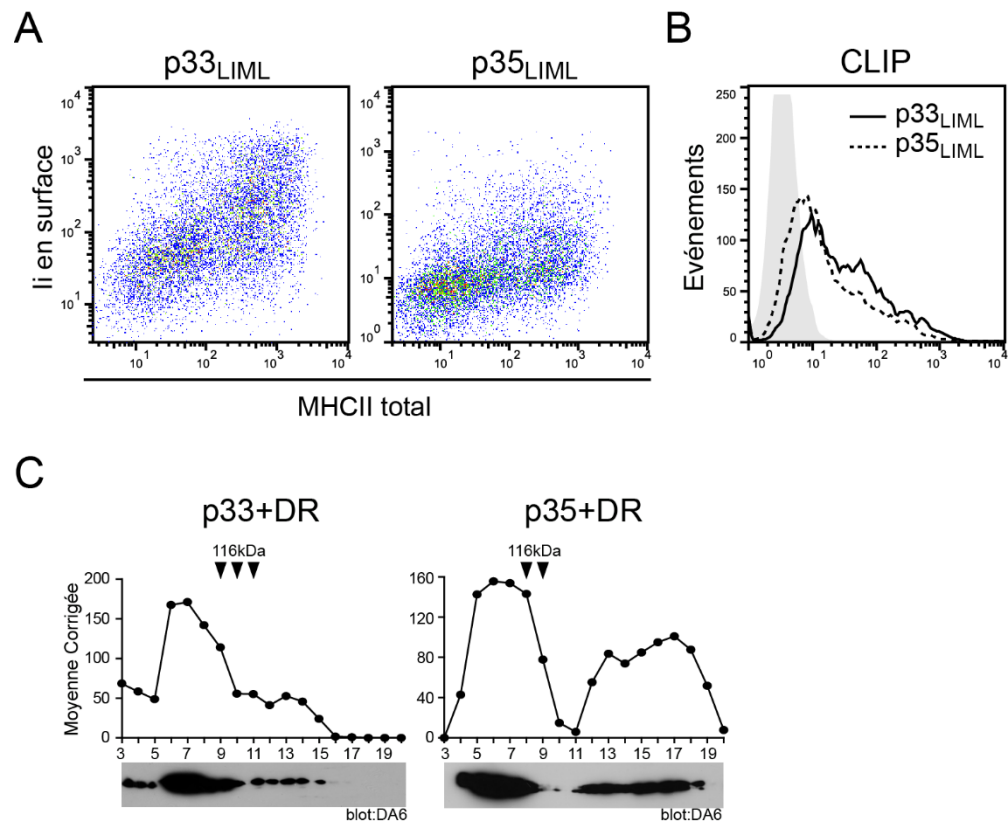
Annexe 4: Séquestration des molécules de classe II par l'expression de MARCH1 induite par IL-10 chez les monocytes.

Annexe 1

Trafic des complexes li-CMHII formés autour des isoformes p33 et p35

- Résultats préliminaires non-publiés –

Lors d'études préliminaires, nous nous sommes interrogés sur la possibilité d'observer une différence entre le trafic de l'isoforme p33 et de p35 par une simple analyse de cytométrie en flux (annexe 1- figure 1A et B). Nous avons ainsi transfecté des HEK293T, de manière transitoire, avec DR et des mutants de p33 ou p35 capables de s'accumuler à la surface cellulaire (p33_{LIML} ou p35_{LIML}). Nous avons procédé à la détection simultanée de li en surface et des CMHII totaux dans ces cellules. Pour un niveau d'expression totale similaire de li et DR, nous avons observé une disparité entre l'expression à la surface de p33_{LIML} et p35_{LIML} (annexe 1 - figure 1A). Alors que p33_{LIML} accède à la surface cellulaire avec des niveaux d'expression de DR faibles, p35_{LIML} requiert une concentration de DR supérieure pour atteindre la surface. Parallèlement, la production de CLIP dans les cellules exprimant p35 est inférieure à celle observée dans les cellules exprimant p33 (annexe 1 - figure 1B). Bien que ces résultats ne dévoilent en aucun cas la stœchiométrie des complexes li-CMHII, ils pointent vers une disparité dans le comportement des isoformes p33 et p35. A posteriori, il est aisé d'imaginer que ces différences coïncident avec la formation de pentamères et nonamères pour p33 et p35, respectivement. La formation de nonamères autour de p35 expliquerait la nécessité d'une grande concentration de DR, dans quel cas les trimères de p35 associés à un ou deux DR seraient retenus dans le RE jusqu'à l'association d'un troisième DR.



Annexe 1 - Figure 1: Formation et trafic des complexes p33-CMHII et p35-CMHII.

(A et B) Des analyses par cytométrie en flux de HEK293T transfectées transitoirement avec DR et les mutants p33_{LIML} ou p35_{LIML} ont été effectuées. **(A)** Les cellules ont été analysées pour l'expression en surface de Ii (anticorps monoclonal (mAb): Bu45) en fonction de l'expression totale de DR (mAb: L243). **(B)** Le marquage en surface pour le peptide CLIP (mAb: Cer-CLIP.1) a été effectué. Le contrôle (courbe ombragée) représente un contrôle isotypique. **(C)** Des HEK293T ont été transfectées avec DR et p33 ou p35 et les lysats ont été soumis à une sédimentation sur gradient de sucrose. Vingt-cinq fractions ont été migrées sur SDS-PAGE. La détection de la chaîne DR α (mAb: DA6) et la détection de la protéine endogène parp 1 (116kDa) à des fins de comparaison entre les deux gradients, ont été effectuées. Les histogrammes représentent la densitométrie moyenne des différentes bandes corrigée avec le bruit de fond correspondant.

En parallèle, nous avons effectué des gradients de sucrose, tels que décrits par Koch *et al*, afin de comparer le poids moléculaire des complexes formés autour des trimères p33 et des trimères p35 (annexe 1 - figure 1C) (Koch et al., 2011). Des HEK293T ont été transfectées avec DR et p33 ou p35 ; les lysats de ces cellules ont été soumis à une ultracentrifugation sur gradient de sucrose et les 25 fractions résultantes analysées par gel SDS-PAGE. La chaîne DR α a été détectée de façon similaire aux deux articles à l'origine de la controverse (Roche et al., 1991a; Koch et al., 2011). Ces résultats préliminaires démontrent que DR α est associée à des complexes possédant un poids moléculaire plus élevé en présence de p35 (fractions 16 à 20) que de p33 (fractions 10 à 15). Les résultats que nous avons obtenus pour l'isoforme p33 rappellent les résultats obtenus par le groupe de Koch *et al*, qui proposent la formation de pentamères (annexe 1 - figure 1C)(Koch et al., 2011). Lors de ces travaux, les auteurs utilisent majoritairement deux types cellulaires humains, les Raji et MelJuso (Koch et al., 2011). Bien que ces deux lignées cellulaires soient normalement en mesure de produire à la fois les isoformes p33 et p35 de la chaîne invariante, les immunobuvardages effectués contre li dans cet article montrent de très faibles quantités de p35. L'observation de formation de pentamères associée à la quasi-absence de p35 dans les expériences de Koch *et al*, s'apparente à l'absence de complexe à haut poids moléculaire que nous observons dans nos gradients de sucrose de p33-DR. Par ailleurs, l'identification initiale de complexes nonamériques par le groupe de Cresswell est effectuée dans des cellules B-LCL Swei, qui expriment une quantité considérable de l'isoforme p35 (Roche et al., 1991a). Or, leurs résultats se comparent à ce que nous observons pour nos gradients de sucrose de DR-p35 (annexe 1 - figure 1C). Ces résultats

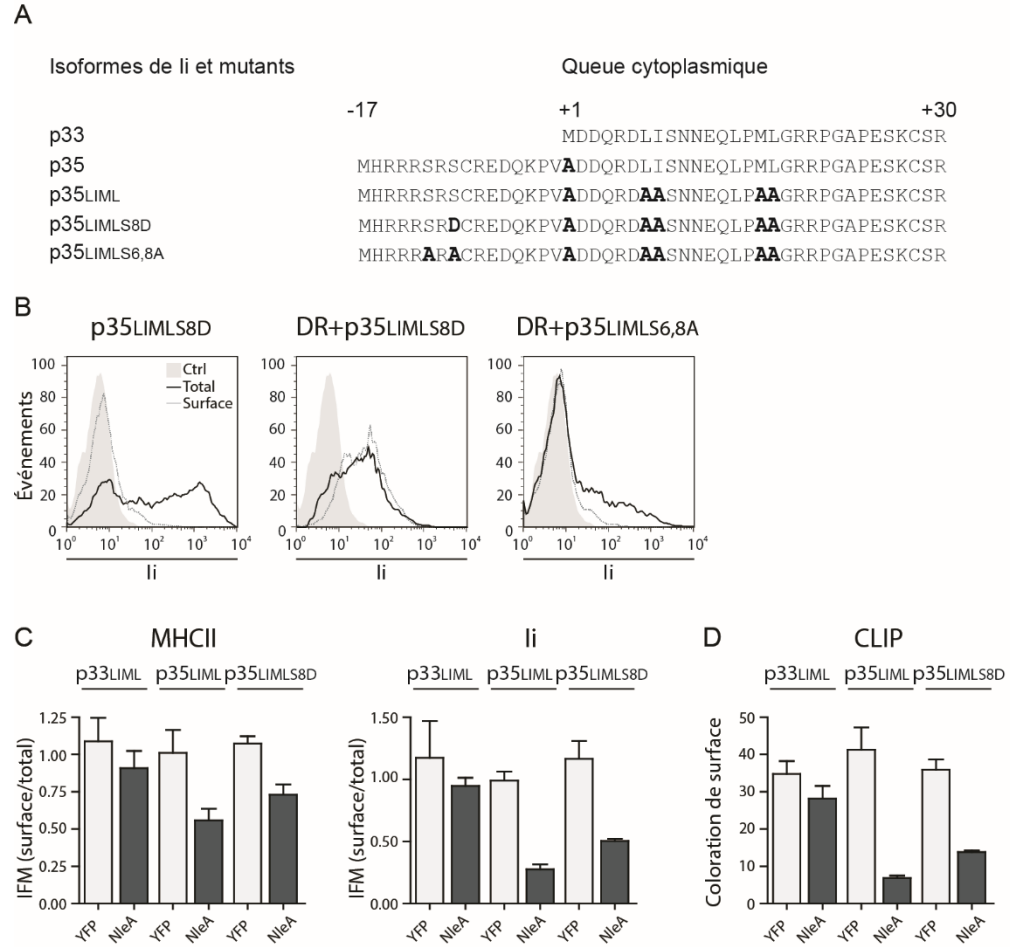
non-publiés suggèrent l'existence de complexes à poids moléculaire plus élevé autour de p35 qu'autour de p33. À la lumière de ces résultats, il semblerait que des complexes pentamériques et nonamériques se forment autour des isoformes p33 et p35, respectivement.

Annexe 2

Transport antérograde des complexes li-CMHII formés autour du mutant p35_{LIMLS8D}

- Résultats préliminaires non-publiés -

Dans le cadre de nos travaux sur le transport antérograde des complexes p35-CMHII, nous avons obtenu des résultats préliminaires non-publiés pour le mutant p35_{LIMLS8D} et le mutant p35_{LIMLS68A} (annexe 2 - figure 1). La séquence de ces mutant de p35_{LIML} est représentée dans la Figure 1A de l'annexe 2. Le mutant p35_{LIMLS8D}, mime la phosphorylation de la sérine 8 par l'ajout d'un acide aminé chargé négativement alors que le mutant p35_{LIMLS68A} empêche toute phosphorylation de l'isoforme p35. Ce mutant p35_{LIMLS8D} accède à la surface cellulaire lorsqu'exprimé avec des CMHII (annexe 2 - figure 1B, panneaux de gauche) alors que le mutant p35_{LIMLS68A} est retenu au RE et ce, même en présence de CMHII (annexe 2 - figure 1B, panneau de droite) (Kuwana et al., 1998). Selon les travaux de Kuwana *et al*, (et nos résultats), il est convenu que la charge négative ou la phosphorylation de la sérine en position 8 est essentielle au transport antérograde de l'isoforme p35. Comme mentionné dans la thèse, 14-3-3 n'interagit pas avec le mutant p35_{S8D} (Kuwana et al., 1998). Ainsi la sortie de RE des complexes p35_{S8D}-CMHII en absence de 14-3-3 (nos résultats et Kuwana *et al*,) remet en question le rôle de ce dernier dans le masquage du motif de liaison de β COP. Ainsi, on peut ainsi s'interroger sur le rôle potentiel de 14-3-3 dans le transport antérograde p35 par les vésicules COPII.



Annexe 2- Figure 1: Transport antérograde des complexes li-CMHII formés autour du mutant p35^{LIMLS8D}. **(A)** Alignement des séquences des queues cytoplasmiques des chaînes invariantes sauvages et des mutants pour les sérines de p35. Les séquences des formes sauvages, p33 et p35, des mutants p35^{LIML}, p35^{LIMLS8D} et p35^{LIMLS6,8A} ont été alignées. Les motifs de ciblage aux endosomes LI/ML ont été inactivés par mutation pour des alanines chez les mutants p35^{LIML}, p35^{LIMLS8D} et p35^{LIMLS6,8A}. La sérine 8 est mutée pour un acide aspartique chez le mutant p35^{LIMLS8D}. Les sérines 6 et 8 sont mutées pour des alanines chez p35^{LIMLS6,8A}. **(B)** Patron d'expression en surface des mutants pour les sérines de p35. Des cellules HEK293T ont été transfectées de manière transitoire avec p35^{LIMLS8D}, p35^{LIMLS8D} + DR ou p35^{LIMLS6,8A} + DR. Après 48h, ces cellules ont été analysées par cytométrie en flux pour détecter l'expression totale des CMHII (mAb L243, données non représentées) ainsi que l'expression totale (ligne noire) et en surface (ligne pointillée grise) des mutants de li (mAb Bu45). Le contrôle (courbe ombragée) représente un contrôle isotypique. **(C et**

D) Impacte le l'expression de NleA sur le transport antérograde du mutant p35_{LIMLS8D}. Des cellules HEK293T ont été transfectées de manière transitoire avec DR en présence de YFP ou NleA-GFP et de p33_{LIML}, p35_{LIML} ou p35_{LIMLS8D}. Après 48h, ces cellules ont été analysées par cytométrie en flux pour les cellules YFP ou GFP positives; **(C)** les ratios de IFM surface/total ont été obtenus pour DR (graphique gauche, mAb: I243) et pour li (graphique droite, mAb : Bu45). **(C)** Expression en surface de CLIP (mAb : cer-CLIP.1) a été obtenue. Ces résultats représentent au moins 2 expériences indépendantes.

Dans le cadre de nos travaux sur le transport antérograde des complexes li-CMHII, nous avons obtenus des résultats préliminaires quant à l'effet de l'expression de NleA sur le trafic du mutant p35_{LIMLS8D} (annexe 2 - figure 1C et D). Ceux-ci suggèrent un effet du facteur de virulence NleA sur l'expression en surface (annexe 2 - figure 1C) et le ciblage aux endosomes (annexe 2 - figure 1D) des complexes p35_{LIMLS8D}-CMHII. En effet, les complexes li-CMHII formés autour du mutant p35_{LIMLS8D} sont moins fortement exprimés en surface chez les cellules positives pour NleA que chez les cellules positives pour YFP (annexe 2 - figure 1C). De plus, la production du peptide CLIP est inférieure pour les cellules exprimant NleA (annexe 2 - figure 1D). Toutefois, l'effet de l'expression de NleA sur les complexes p35_{LIMLS8D}-CMHII semble moins complet que pour les complexes p35-CMHII (annexe 2 - figure 1C, D). En effet, une faible expression en surface du CLIP et des complexes li-CMHII semble persistée pour le mutant p35_{LIMLS8D}. Dans un premier temps, ces résultats proposent que le trafic des complexes p35_{LIMLS8D}-CMHII se fait majoritairement par les vésicules COPII. Ainsi, comme l'absence d'interaction avec 14-3-3 n'affecte pas le ciblage de ces complexes

aux vésicules COPIIs, il est invraisemblable que le rôle de l'interaction de 14-3-3 à l'isoforme p35 soit relié au ciblage vers vésicules COPIIs.

Dans un deuxième temps, comme on observe une différence dans la sensibilité du mutant p35_{LIMLS8D} par rapport p35 lors de l'expression de NleA, il est possible de penser que la mutation de la sérine 8 pour un acide chargé négativement affecte l'efficacité d'un motif de ciblage aux vésicules COPIIs. Cette observation pourrait indiquer un rôle éventuel de la phosphorylation de la sérine 8 ou du motif arginine dans le ciblage aux vésicules COPII.



Exposing the specific roles of the invariant chain isoforms in shaping the MHC class II peptidome

Jean-Simon Fortin, Maryse Cloutier and Jacques Thibodeau*

Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

Edited by:

Laura Santambrogio, Albert Einstein College of Medicine, USA

Reviewed by:

Masaaki Murakami, Osaka University, Japan

Laura Santambrogio, Albert Einstein College of Medicine, USA

*Correspondence:

Jacques Thibodeau, Laboratoire d'Immunologie Moléculaire, Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, C.P. 6128 Succ. Centre-Ville, Montréal, QC H3C 3J7, Canada
e-mail: jacques.thibodeau@umontreal.ca

The peptide repertoire (peptidome) associated with MHC class II molecules (MHCII) is influenced by the polymorphic nature of the peptide binding groove but also by cell-intrinsic factors. The invariant chain (Ii) chaperones MHCII, affecting their folding and trafficking. Recent discoveries relating to Ii functions have provided insights as to how it edits the MHCII peptidome. In humans, the Ii gene encodes four different isoforms for which structure-function analyses have highlighted common properties but also some non-redundant roles. Another layer of complexity arises from the fact that Ii heterotrimerizes, a characteristic that has the potential to affect the maturation of associated MHCII in many different ways, depending on the isoform combinations. Here, we emphasize the peptide editing properties of Ii and discuss the impact of the various isoforms on the MHCII peptidome.

Keywords: invariant chain, p35, di-leucine motif, di-arginine motif, MHCII trafficking, antigen presentation, MHCII

The invariant chain (Ii; CD74) has multiple functions but is best characterized as the main MHC class II (MHCII) chaperone. Ii is a type II protein consisting of a short cytoplasmic tail, a trans-membrane region and a luminal domain that can be further partitioned into a membrane-proximal disordered region, the main MHCII-interacting sequence (CLIP), and a C-terminal trimerization domain (1, 2). Mice express two Ii isoforms, p31 and p41, the latter resulting from alternative splicing (3). In humans, the corresponding isoforms are known as p33 and p41. Additionally, around 20% of the Ii mRNAs are translated from an upstream start codon that generates the p35 and p43 isoforms. These bear a 16-amino acid cytoplasmic extension including a strong di-arginine (RxR) ER retention motif (4–6).

Synthesized alongside MHCII, Ii can be viewed as: (i) a GUARDIAN that controls access to the MHCII groove; (ii) a SCAFFOLD that assists folding and pairing of α and β MHCII chains; and (iii) a LEADER that directs MHCII to the endosomal pathway. It is well established that these Ii functions depend primarily on the ability of its CLIP region to occupy the peptide groove of MHCII. Numerous reports showed that Ii proteolysis in endosomes allows HLA-DM to free the groove of CLIP and to catalyze the binding of nominal antigenic peptides [reviewed in Ref. (7)]. Herein, we describe the main chaperone functions of Ii and discuss how the various isoform-specific features can modulate its peptidome-editing properties (Figures 1A–D).

GUARDIAN

Early results on the role of Ii have revealed its importance in the presentation of intact Ags (8). By guiding MHCII to endosomes while blocking their Ag-binding groove, Ii allows MHCII to gain access to peptides from processed Ags and thus influences the

pool of associated-peptides (9). This is best exemplified by the differential reactivity of a panel of autoreactive T cell clones co-cultured with Ii⁺ or Ii[−] APCs (10). Indeed, the content of the MHCII groove differs in transfected cell lines whether or not Ii is expressed. In a mass spectrometry analysis of DR4-eluted peptides, lack of Ii biased the peptide origin toward cytoplasmic proteins, whereas Ii allowed the binding of peptides derived from exogenous and endocytic proteins (11). Also, the repertoire is strongly skewed in Ii KO mice, as demonstrated by mixed lymphocyte reactions and aberrant CD4⁺ T cell selection (12–18). In humans however, little is known on the impact of Ii deficiency in different cell types. The effect of Ii on the peptidome varies and following its degradation, the residual CLIP peptide also affects the peptide's assortment to be presented to T lymphocytes. Indeed, a series of articles from Mellins and collaborators describing the MHCII-CLIP affinity relationship suggest that poor Ii and CLIP chaperoning leads to Ag processing defects with the potential to instigate MHCII-associated autoimmunity (19–23).

In the absence of Ii, both mouse and human MHCII bind a collection of long polypeptides, most likely originating from misfolded ER proteins (24–26). Interestingly, even in the presence of Ii, it was recently reported that MHCII displayed some ER polypeptides at the plasma membrane, the latter competing with Ii for the class II binding groove (27). Despite the fact that MHCII can associate with ER polypeptides, there are numerous functional examples of endogenous and exogenous CD4 T cell epitopes that are presented in the absence of Ii expression [reviewed in Ref. (28)]. While presentation of some of these peptides was negatively affected by the presence of Ii, others were Ii-independent and loaded on recycling MHCII (29, 30). Ii is usually produced in vast excess and most if not all MHCII matures in association

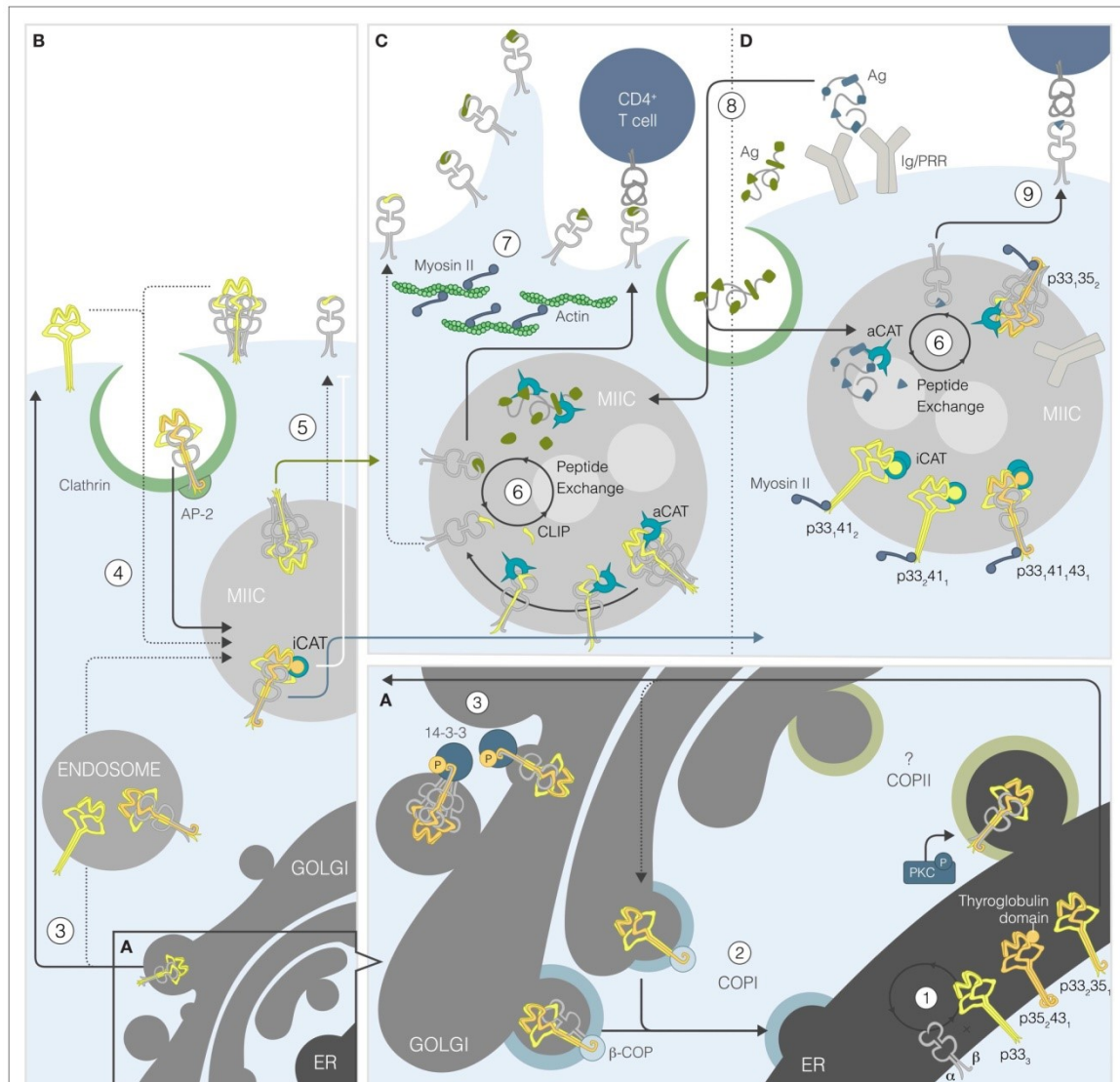


FIGURE 1 | Portrait of the role of the human invariant chain in MHCII presentation. (A) MHCII α and β chains assemble with Ii in the ER [1]. The four Ii isoforms randomly associate into trimers, some of which bear ER retention motif(s) and/or thyroglobulin domain(s). Unphosphorylated lip35/p43-containing trimers, associated with MHCIIIs or not, exit the ER but are recognized by β -COP and undergo retrograde transport [2]. The MHCII-bound Ii that gets phosphorylated by PKC binds 14-3-3 β , thereby preventing β -COP binding and allowing anterograde transport [3]. (B) From the Golgi, the different complexes gain access to the plasma membrane or early endosomes [3]. The complexes at the plasma membrane reach the MHCII-rich compartment (MIIC) after being internalized into clathrin-coated pits [4]. In endosomes, presence of p41/43 will reduce processing by inhibiting cathepsin S (iCAT) and slowing-down Ii processing and/or

transport to the cell surface [5]. (C) In multivesicular MIICs, the carboxy-terminal trimerization domain of Ii is cleaved by non-cysteine proteases, generating the p22 fragment. Then, cysteine proteases remove the glycosylated portion to form the p10 fragment before active cathepsin S (aCAT) cuts the anchored portion, leaving CLIP in the MHCII groove. CLIP is then exchanged for an antigenic peptide spontaneously or by DM [6]. Ii degradation frees myosin II, which can restore the cell motility and remodeling of endosomes [7]. (D) Antigens are internalized by pinocytosis or receptor-mediated endocytosis and degraded by proteases, including cathepsins [8]. In the presence of p41/43, processing is more focused given the inactivation of cathepsins. Thus, the MHCIIIs that gain access to the plasma membrane present peptides derived from receptor-mediated Ag internalization to CD4⁺ T cells [9].

with Ii (31). Still, it is tempting to speculate that under some physiological conditions, the Ii/MHCII protein ratio may decrease sufficiently to impact the peptidome. Accordingly, knocking down Ii in cancers represents a possible therapeutic avenue, allowing these cells to present new antigens to tumor infiltrating T cells (32, 33).

Beside the gross peptidome alterations noted in the non-physiological absence of Ii, subtle variations have been observed when MHCII α s were expressed in the context of specific Ii isoforms. The GUARDIAN role of Ii is not exclusively CLIP-centered but also shaped by the p41/43 thyroglobulin domain, which regulates the proteolytic activity of numerous cathepsins (18, 34–37). Among them, CatS breaks down large polypeptides and provokes MHC/Ii complex dissociation by cleaving Ii between the trans-membrane and CLIP regions in APCs (38). In thymic epithelial cells, CatV (CatL in mice) occupies this role although redundancy between cathepsin family members is observed (39, 40). As a result, MHCII α s are freed from Ii cytoplasmic targeting and may egress to the plasma membrane. It has also been suggested that the effect of p41/43 is echoed to surrounding Ii (p33/35), limiting overall processing, and that the thyroglobulin domain chaperones cathepsins, increasing half-life and maintaining a pool of mature enzymes in the MIICs (41, 42). The proportion of p41/43 isoforms varies from 10 to 40% in professional APCs and this provides a mechanism to modulate cathepsin activity (43). Lastly, it has been shown that Ii luminal domain is involved in increasing the half-life of MHCII by delaying endosomal maturation (44). As a result, the pool of antigenic peptide could be skewed toward receptor-mediated protein intake taking place in the highly specialized MIICs (Figure 1D). To efficiently protect the cell from aberrant Ag presentation, the Ii isoforms must work as a team. As seen in Tg mice expressing exclusively one mouse or human Ii isoform, whether p31, p35 or p41, Ag presentation, and CD4 T cell selection can be restored (18, 45–48). Still, Ag presentation by alternatively spliced isoforms was not equivalent, suggesting the existence of divergent pathways (18, 34). Also, the differential outcomes of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) or asthma in p31- vs p41-expressing mice point to distinct class II peptide repertoire (45, 49). Along the same lines, it was reported that NOD mice devoid of Ii are protected from developing type 1 diabetes (50). The isoform balance is put into perspective by Baugh et al., which demonstrated that the onset of experimental EAE and rheumatoid arthritis are delayed when cathepsin S inhibitors are administered to mice (51). Further study of the distinct roles of Ii is much needed to understand the implication of the various isoforms in immunity. Altogether, these observations clearly demonstrate the general impact of Ii on the MHCII peptidome and the subtle editing role of the exon 6b-encoded domain.

SCAFFOLD

While transfected MHCII α s could egress from the ER in cell lines, Ii was found to favor the pairing and trafficking of haplotype-matched and -mismatched α and β chains (52, 53). Some key properties of Ii became apparent with the characterization of Ii-deficient mice, although cell-type- and haplotype-dependent differences were reported (54). A detailed sequence of events leading

to formation of the MHCII/Ii complex was first described by Cresswell and collaborators (Figure 1A) (55). According to the model proposed by Roche et al. three assembled MHCII $\alpha\beta$ heterodimers associate sequentially with a preformed Ii trimer, generating a pentamer, then a heptamer, and ultimately a nonamer with the ability to egress from the ER (56). This dogma was later refined to include intermediate steps such as the initial binding of Ii to an MHCII α chain prior to the pairing of an isotype-matched β chain (57, 58). Although a variety of chaperones such as BIP and calnexin have been shown to interact with the MHCII Ag presentation machinery, their exact role in the final assembly and ER egress of the MHCII/Ii complex is not well defined (55, 59). Furthermore, the interaction between calnexin and MHCII α s until the final nonamer formation suggested that egress is tightly restricted (60). However, given the existence of transport-competent heptamers and pentamers, it does not appear that universal quality control mechanisms are in place to prevent egress of non-stoichiometric complexes (60–62). As MHCII-free Ii trimers can egress from the ER, the relative abundance of MHCII α s and Ii likely influences the complex stoichiometry. Cell-type-specific differences and the affinity of CLIP for the MHCII groove may come into play as well.

In humans, although p33 is the most abundant isoform and generates some homotrimers, it is mostly part of heterotrimers that have also incorporated an RxR-containing moiety (63–65). By analogy to other multi-protein complexes such as the K_{ATP} channel (66), the di-arginine motif would prevent premature ER egress of MHCII-unsaturated Ii trimers (i.e., pentamers and heptamers). Indeed, p35/43 require binding of the MHCII β chain for anterograde trafficking (67–69). Although less abundant than their respective lip33/p41 counterparts, p35/43 are dominant as the stochastic incorporation of a single RxR-bearing Ii moiety will prevent ER egress of a heterotrimer (70, 71). Thus, p35/p43 will favor the formation of high-order MHCII/Ii oligomers. Indeed, as p35/43 both need to be phosphorylated by PKC and be associated with MHCII α s to become transport competent, they form larger complexes and egress less efficiently than homotrimers devoid of RxR-containing subunits (Figure 1A) (65, 72, 73). A MHCII molecule binding a p33₂p35₁ heterotrimer would have only one chance out of three to egress the ER as a pentamer. This of course is assuming that the MHCII cannot mask the RxR motif in *trans*. This is an important issue as it was recently suggested that steric hindrance caused by the plasma membrane and the bending of the MHCII/Ii complex only allows formation of pentamers (61). If this holds true, we have to assume that a *cis* interaction between the MHCII and p35/43 is not required to overcome the retention motif, otherwise many doomed complexes would be formed.

The advantage, if any, conferred by the presence of an ER retention motif in p35/43 remains obscure. A variable Ii/MHCII stoichiometry may modulate the MHCII α s turnaround and thus, the peptidome that is displayed to T cells. One can imagine that although Ii is in excess, its retention of Ii increases the available ER pool and ensures that the ratio of free over Ii-bound MHCII α s is as low as possible. This way, most MHCII α s would acquire their final cargo in the endocytic pathway instead of the ER. Whether or not the cell can modulate its physiology to favor the binding of endogenous ER peptides remains to be seen.

LEADER

The fundamental functional distinction between MHCI and MHCII molecules comes from the fact that they acquire peptides in different locations (74). The seminal studies of Ziegler and Unanue demonstrated that the presentation of CD4 T cell epitopes by MHCII was inhibited by chloroquine, highlighting the importance of low pH compartments (75, 76). Evidence for a role of Ii in the trafficking of MHCII to endosomes has been described in numerous reviews (55, 77, 78). In the absence of Ii, MHCII are not transported to endocytic compartments as efficiently and accumulate at the plasma membrane (4, 5). Confocal and electron microscopy experiments using transfected cell lines revealed that a clear colocalization of MHCII with endosomal markers or internalized antigens required co-expression of Ii (70, 79). Deletion and site-directed mutagenesis experiments established the importance of the cytoplasmic domain for intracellular trafficking and allowed the mapping of two classical leucine-based endosomal sorting signals in all Ii isoforms (79).

In line with the role of the leucine-based motifs in Ii degradation and CLIP removal, it was shown that deletion of the Ii cytoplasmic tail resulted in the cell-surface display of Ii/MHCII complexes being unable to acquire antigenic peptides (80). In contrast, one can wonder if the specific characteristics of p35/43 affect transport of the complex and, ultimately, the peptidome. Many studies using various Ii⁺ cell types and transfected cell lines have reported that even in the absence of MHCII, some p33/p41 homotrimers gain access to post-Golgi compartments and acquire complex N- and O-linked oligosaccharides (4, 5, 68, 81). However, as mentioned above, p35/p43-containing trimers are retained in the ER (63). The general model stipulates that an unphosphorylated p35 moiety binds β -COP upon arrival at the cis-Golgi sorting station, causing the retrograde transport of the complex in COPI-coated vesicles and the apparent steady-state ER retention (82) (Figure 1A). However, when phosphorylated by PKC on serine 8, Ii recruits 14-3-3 β to prevent the binding of β -COP on the RxR motif (47, 56–58, 73). Still, it remains to be determined how the complex is transported from the ER to the Golgi. While largely undefined, export signals have been described in some cargo proteins, allowing their incorporation in COPII-coated transport vesicles originating at ER exit sites (83). Other transmembrane proteins exit through the default pathway (84). Whether the 16-amino acid extension of p35/43 confers specific sorting properties to MHCII in such early step as ER egress has yet to be addressed. Another important question that remains is, if the RxR motif is masked by 14-3-3 β , why can't a phosphorylated Ii trimer be released from the Golgi in MHCII-negative cells? Although there is compelling evidence for competition between 14-3-3 β and β -COP, the need for MHCII in the transport of p35/p43-containing complexes beyond the Golgi apparatus was overlooked in previous studies and remains unexplained.

The stringent quality control mechanism operating at the level of the Golgi suggests that p35/p43-including complexes do not simply reach the plasma membrane through the default pathway. Many groups have studied the route taken by the MHCII/Ii complex to reach the late endosomes/lysosomes [reviewed in Ref. (85)] (Figure 1B). It is now recognized that AP-2 adaptors, which connect cargo and plasma membrane clathrin-coated pits, are

important in the sorting of MHCII/Ii complexes to the endocytic pathway. The actual model proposes that the bulk of MHCII/Ii complexes exit the Golgi by a clathrin-independent mechanism en route to the plasma membrane where they are internalized in association with AP-2 [Ref. (86, 87) and references therein]. However, one must bear in mind that there could be important cell-type differences in the transport of MHCII. Also, in some of the studies looking at the trafficking of Ii, it is not entirely clear which Ii isoform(s) was (were) expressed and in what proportions. Thus, a thorough comparison of p35 and p33 trafficking is much needed.

One clear difference in the trafficking of p33 and p35 is that the latter is not detected at the plasma membrane (71, 72). Kuwana et al. have shown in transfected cells that a dominant-negative form of dynamin caused the cell-surface display of p35, suggesting that in fact, p33 and p35 follow the same path to endosomes (72). The reason why the internalization kinetics of phosphorylated p35 is increased as compared to p33 is not known but may relate to its affinity for AP-2 (88).

Many groups have documented the impact of Ii on the endocytic pathway [see Ref. (78)] (Figure 1C). Ii-expressing cells accumulate large endosomes, in which Ag and MHCII degradation is slowed (89–93). Such effects are dependent on the cytoplasmic tail and the luminal trimerization domain common to all Ii isoforms. However, based on studies using cathepsin KO mice, it became clear that the Ii thyroglobulin domain exerts further pressure on MHCII trafficking and maturation by limiting cathepsin-mediated degradation while preventing cathepsin-sensitive epitopes from proteolysis (94–96). Surprisingly, p41/43 and cathepsins were shown to colocalize in compartments not implicated in Ag presentation, a finding suggesting a role in phagocytosis rather than Ag processing (97). In light of the recent results by Faure-André et al. describing Ii-myosin II interactions, it seems that Ii is also involved in cell motility/remodeling (98) (Figures 1C,D). Reduced Ii processing caused by p41/43 would increase the MIIC's interaction with the myosin II motor, providing necessary extraction force to internalize membrane Ag in these compartments (99). The endocytic pathway is a complex system made of different tubular/vesicular entities and the exact location where MHCII acquire peptides is still debated (100, 101). It is unknown if p35/p43 have additional modulatory properties that could translate into a change in the peptidome and the contribution of each isoform to the endocytic landscape covered by Ii remains to be evaluated (102, 103).

CONCLUDING REMARKS

The list of functions ascribed to Ii is continuously growing. Beside its many roles in MHCII Ag presentation, Ii was shown to chaperone other presentation molecules, such as CD1d. As this class 1b molecule acquires its ligands in the endocytic pathway, the role of Ii in the selection of lipid Ags is of great interest (104). Recently, Ii was shown to have a key impact in cross-presentation, suggesting that its isoforms may fine tune the peptide repertoire associated with MHCI molecules in DCs (105).

The Ii pool is highly heterogeneous and an important question that remains is the potential isoform-specific influence of post-translational modifications such as the addition of a glycosaminoglycan (chondroitin sulfate, CS) side chain in the ER/Golgi (106).

Ii-CS binds CD44 and can enhance T cell responses (107). Given that p35/p43 regulate surface display of Ii trimers (71), it would be interesting to determine in humans the contribution of these isoforms on the chaperone-independent functions of Ii, such as being a cell-surface receptor for the macrophage migration inhibition factor (MIF) and *Helicobacter pylori* (108). Whether alternative splicing affects the affinity of these ligands for the Ii receptor remains to be measured. Interestingly, the cytoplasmic tail is pivotal in the capacity of Ii to transduce signals in response to MIF or after endosomal cleavage of its transmembrane region by Sppl2a (109–111). The potency of p35/p43 in this context should be tested.

The existence of Ii isoforms offers multiple layers of control over Ag presentation. Major transformations occur during the activation of APCs following, for example, microbial activation of pattern recognition receptors (PRRs) signaling pathways. If mediators of the inflammatory response (IFN- γ , TNF- α , IL-10 etc) can modulate the behavior of Ii isoforms and if the ensuing changes in the expression levels of MHCII or Ii can affect the peptidome should be systematically addressed. Evidence that the relative proportions of these isoforms can somehow be regulated comes from the study of chronic lymphocytic leukemia in which overexpression of p35 has been reported (112, 113). Whether p35 plays a role in tumor escape from the immune system by modulating the peptidome remains to be determined. Also, differential p35 expression between B cells from monozygotic twins discordant for type 1 diabetes was shown to affect Ag presentation and could potentially contribute to the development of the disease (114). On a final note, expression of Ii-Ag fusion proteins in APCs represents a potential immunization strategy that targets Ags directly to endosomes and skews the peptidome (115, 116). Alternatively, recombinant proteins have been engineered by replacing CLIP with the sequence of a T cell epitope (117). The efficacy of these promising vaccine approaches may benefit from the study of the biology of the various Ii isoforms.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Canadian Institutes for Health Research (#93592), the Cancer Research Society and the National Science and Engineering Research Council of Canada (#298537) to Jacques Thibodeau.

REFERENCES

- Singer PA, Lauer W, Dembicz Z, Mayert WE, Lipp J, Koch N, et al. Structure of the murine Ia-associated invariant (Ii) chain as deduced from a cDNA clone. *EMBO J* (1984) 3(4):873–7.
- Cresswell P. Chemistry and functional role of the invariant chain. *Curr Opin Immunol* (1992) 4:87–92. doi:10.1016/0952-7915(92)90131-W
- Yamamoto K, Floyd-Smith G, Francke U, Koch N, Lauer W, Dobberstein B, et al. The gene encoding the Ia-associated invariant chain is located on chromosome 18 in the mouse. *Immunogenetics* (1985) 21(1):83–90. doi:10.1007/BF00372244
- Bakke O, Dobberstein B. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* (1990) 63:707–16. doi:10.1016/0092-8674(90)90137-4
- Lotteau V, Teyton L, Peleraux A, Nilsson T, Karlsson L, Schmid SL, et al. Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain. *Nature* (1990) 348:600–5. doi:10.1038/348600a0
- Strubin M, Berte C, Mach B. Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain. *EMBO J* (1986) 5:3485–8.
- Wolf PR, Ploegh HL. How MHC class II molecules acquire peptide cargo: biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* (1995) 11:267–306. doi:10.1146/annurev.cb.11.110195.001411
- Stockinger B, Pessara U, Lin RH, Habicht J, Grez M, Koch N. A role of Ia-associated invariant chains in antigen processing and presentation. *Cell* (1989) 56(4):683–9. doi:10.1016/0092-8674(89)90590-4
- Busch R, Rinderknecht CH, Roh S, Lee AW, Harding JJ, Burster T, et al. Achieving stability through editing and chaperoning: regulation of MHC class II peptide binding and expression. *Immunol Rev* (2005) 207:242–60. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00306.x
- Lightstone L, Hargreaves R, Bobek G, Peterson M, Aichinger G, Lombardi G, et al. In the absence of the invariant chain, HLA-DR molecules display a distinct array of peptides which is influenced by the presence or absence of HLA-DM. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997) 94:5772–7. doi:10.1073/pnas.94.11.5772
- Muntasell A, Carrascal M, Alvarez I, Serradell L, van Veelen P, Verreck FA, et al. Dissection of the HLA-DR4 peptide repertoire in endocrine epithelial cells: strong influence of invariant chain and HLA-DM expression on the nature of ligands. *J Immunol* (2004) 173:1085–93.
- Tourne S, Nakano N, Viville S, Benoist C, Mathis D. The influence of invariant chain on the positive selection of single T cell receptor specificities. *Eur J Immunol* (1995) 25:1851–6. doi:10.1002/eji.1830250709
- Viville S, Neefjes J, Lotteau V, Dierich A, Lemeur M, Ploegh H, et al. Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* (1993) 72:635–48. doi:10.1016/0092-8674(93)90081-Z
- Grubin CE, Kovats S, DeRoos P, Rudensky AY. Deficient positive selection of CD4 T cells in mice displaying altered repertoires of MHC class II-bound self-peptides. *Immunity* (1997) 7:197–208. doi:10.1016/S1074-7613(00)80523-3
- Wong P, Rudensky AY. Phenotype and function of CD4+ T cells in mice lacking invariant chain. *J Immunol* (1996) 156:2133–42.
- Bodmer H, Viville S, Benoist C, Mathis D. Diversity of endogenous epitopes bound to MHC class II molecules limited by invariant chain. *Science* (1994) 263:1284–6. doi:10.1126/science.7510069
- Bikoff EK, Huang LY, Episkopou V, van Meerwijk J, Germain RN, Robertson EJ. Defective major histocompatibility complex class II assembly, transport, peptide acquisition, and CD4+ T cell selection in mice lacking invariant chain expression. *J Exp Med* (1993) 177:1699–712. doi:10.1084/jem.177.6.1699
- Bikoff EK, Kenty G, Van Kaer L. Distinct peptide loading pathways for MHC class II molecules associated with alternative Ii chain isoforms. *J Immunol* (1998) 160:3101–10.
- Hou T, Macmillan H, Chen Z, Keech CL, Jin X, Sidney J, et al. An insertion mutant in DQA1*0501 restores susceptibility to HLA-DM: implications for disease associations. *J Immunol* (2011) 187:2442–52. doi:10.4049/jimmunol.1100255
- Fallang L, Roh S, Holm A, Bergseng E, Yoon T, Fleckenstein B, et al. Complexes of two cohorts of CLIP peptides and HLA-DQ2 of the autoimmune DR3-DQ2 haplotype are poor substrates for HLA-DM. *J Immunol* (2008) 181:5451–61.
- Doebele RC, Pashine A, Liu W, Zaller DM, Belmares M, Busch R, et al. Point mutations in or near the antigen-binding groove of HLA-DR3 implicate class II-associated invariant chain peptide affinity as a constraint on MHC class II polymorphism. *J Immunol* (2003) 170(9):4683–92.
- Rinderknecht CH, Roh S, Pashine A, Belmares MP, Patil NS, Lu N, et al. DM influences the abundance of major histocompatibility complex class II alleles with low affinity for class II-associated invariant chain peptides via multiple mechanisms. *Immunology* (2010) 131(1):18–32. doi:10.1111/j.1365-2567.2010.03282.x
- Rinderknecht CH, Belmares MP, Catanzarite TLW, Bankovich AJ, Holmes TH, Garcia KC, et al. Posttranslational regulation of I-E α by affinity for CLIP. *J Immunol* (2007) 179:5907–15.
- Busch R, Vturina IY, Drexler J, Momburg F, Hammerling GJ. Poor loading of major histocompatibility complex class II molecules with endogenously synthesized short peptides in the absence of invariant chain. *Eur J Immunol* (1995) 25:48–53. doi:10.1002/eji.1830250110
- Busch R, Cloutier I, Sekaly RP, Hammerling GJ. Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum. *EMBO J* (1996) 15:418–28.

26. Rovere P, Forquet F, Zimmermann VS, Trucy J, Ricciardi-Castagnoli P, Davoust J. Dendritic cells from mice lacking the invariant chain express high levels of membrane MHC class II molecules in vivo. *Adv Exp Med Biol* (1997) **417**:195–201. doi:10.1007/978-1-4757-9966-8_33
27. Jiang Y, Arase N, Kohyama M, Hirayasu K, Suenaga T, Jin H, et al. Transport of misfolded endoplasmic reticulum proteins to the cell surface by MHC class II molecules. *Int Immunol* (2013) **25**:235–46. doi:10.1093/intimm/dxs155
28. Ceman S, Sant AJ. The function of invariant chain in class II-restricted antigen presentation. *Semin Immunol* (1995) **7**:373–87. doi:10.1006/smim.1995.0042
29. Long EO, LaVaute T, Pinet V, Jaraquemada D. Invariant chain prevents the HLA-DR-restricted presentation of a cytosolic peptide. *J Immunol* (1994) **153**:1487–94.
30. Pinet V, Vergelli M, Martin R, Bakke O, Long EO. Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules. *Nature* (1995) **375**:603–6. doi:10.1038/375603a0
31. Marks MS, Blum JS, Cresswell P. Invariant chain trimers are sequestered in the rough endoplasmic reticulum in the absence of association with HLA class II antigens. *J Cell Biol* (1990) **111**:839–55. doi:10.1083/jcb.111.3.839
32. Chornoguz O, Gapeev A, O'Neill MC, Ostrand-Rosenberg S. Major histocompatibility complex class II+ invariant chain negative breast cancer cells present unique peptides that activate tumor-specific T cells from breast cancer patients. *Mol Cell Proteomics* (2012) **11**:1457–67. doi:10.1074/mcp.M112.019232
33. Thibodeau J, Bourgeois-Daigneault M-C, Lapointe R. Targeting the MHC class II antigen presentation pathway in cancer immunotherapy. *Oncotarget* (2012) **1**:908–16. doi:10.4161/onc.21205
34. Peterson M, Miller J. Antigen presentation enhanced by the alternatively spliced invariant chain gene product p41. *Nature* (1992) **357**:596–8. doi:10.1038/357596a0
35. Jasanoff A, Song S, Dinner AR, Wagner G, Wiley DC. One of two unstructured domains of Ii becomes ordered in complexes with MHC class II molecules. *Immunity* (1999) **10**:761–8. doi:10.1016/S1074-7613(00)80075-8
36. Mihelic M, Doberssek A, Guncar G, Turk D. Inhibitory fragment from the p41 form of invariant chain can regulate activity of cysteine cathepsins in antigen presentation. *J Biol Chem* (2008) **283**:14453–60. doi:10.1074/jbc.M801283200
37. Pierre P, Shachar I, Matza D, Gatti E, Flavell RA, Mellman I. Invariant chain controls H2-M proteolysis in mouse splenocytes and dendritic cells. *J Exp Med* (2000) **191**:1057–62. doi:10.1084/jem.191.6.1057
38. Amigorena S, Webster P, Drake J, Newcomb J, Cresswell P, Mellman I. Invariant chain cleavage and peptide loading in major histocompatibility complex class II vesicles. *J Exp Med* (1995) **181**:1729–41. doi:10.1084/jem.181.5.1729
39. Nakagawa T. Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* (1998) **280**:450–3. doi:10.1126/science.280.5362.450
40. Hsing LC, Rudensky AY. The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev* (2005) **207**:229–41. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00310.x
41. Fineschi B, Arneson LS, Naujokas MF, Miller J. Proteolysis of major histocompatibility complex class II-associated invariant chain is regulated by the alternatively spliced gene product, p41. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995) **92**:10257–61. doi:10.1073/pnas.92.22.10257
42. Lennon-Duménil AM, Roberts RA, Valentijn K, Driessen C, Overkleef HS, Erickson A, et al. The p41 isoform of invariant chain is a chaperone for cathepsin L. *EMBO J* (2001) **20**:4055–64. doi:10.1093/emboj/20.15.4055
43. Kämpgen E, Koch N, Koch F, Stöger P, Heufler C, Schuler G, et al. Class II major histocompatibility complex molecules of murine dendritic cells: synthesis, sialylation of invariant chain, and antigen processing capacity are down-regulated upon culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1991) **88**:3014–8. doi:10.1073/pnas.88.8.3014
44. Landsverk OJB, Barois N, Gregers TF, Bakke O. Invariant chain increases the half-life of MHC II by delaying endosomal maturation. *Immunol Cell Biol* (2011) **89**:619–29. doi:10.1038/icb.2010.143
45. Slavin AJ, Soos JM, Stuve O, Patarroyo JC, Weiner HL, Fontana A, et al. Requirement for endocytic antigen processing and influence of invariant chain and H-2M deficiencies in CNS autoimmunity. *J Clin Invest* (2001) **108**:1133–9. doi:10.1172/JCI200113360
46. Genève L, Chemali M, Desjardins M, Labrecque N, Thibodeau J. Human invariant chain isoform p35 restores thymic selection and antigen presentation in CD74-deficient mice. *Immunol Cell Biol* (2012) **90**:896–902. doi:10.1038/icb.2012.27
47. Naujokas MF, Arneson LS, Fineschi B, Peterson ME, Sitterding S, Hammond AT, et al. Potent effects of low levels of MHC class II-associated invariant chain on CD4+ T cell development. *Immunity* (1995) **3**:359–72. doi:10.1016/1074-7613(95)90120-5
48. Shachar I, Elliott EA, Chasoff B, Grewal IS, Flavell RA. Reconstitution of invariant chain function in transgenic mice in vivo by individual p31 and p41 isoforms. *Immunity* (1995) **3**:373–83. doi:10.1016/1074-7613(95)90121-3
49. Ye Q, Finn PW, Sweeney R, Bikoff EK, Riese RJ. MHC class II-associated invariant chain isoforms regulate pulmonary immune responses. *J Immunol* (2003) **170**:1473–80.
50. Mellanby RJ, Koonce CH, Monti A, Phillips JM, Cooke A, Bikoff EK. Loss of invariant chain protects nonobese diabetic mice against type 1 diabetes. *J Immunol* (2006) **177**:7588–98.
51. Baugh M, Black D, Westwood P, Kinghorn E, McGregor K, Bruin J, et al. Therapeutic dosing of an orally active, selective cathepsin S inhibitor suppresses disease in models of autoimmunity. *J Autoimmun* (2011) **36**:201–9. doi:10.1016/j.jaut.2011.01.003
52. Layet C, Germain RN. Invariant chain promotes egress of poorly expressed, haplotype-mismatched class II major histocompatibility complex A alpha B beta dimers from the endoplasmic reticulum/cis-Golgi compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1991) **88**:2350–64. doi:10.1073/pnas.88.6.2346
53. Sekaly RP, Tonnel C, Strubin M, Mach B, Long EO. Cell surface expression of class II histocompatibility antigens occurs in the absence of the invariant chain. *J Exp Med* (1986) **164**:1490–504. doi:10.1084/jem.164.5.1490
54. Bikoff EK, Germain RN, Robertson EJ. Allelic differences affecting invariant chain dependency of MHC class II subunit assembly. *Immunity* (1995) **2**:301–10. doi:10.1016/1074-7613(95)90054-3
55. Cresswell P. Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* (1994) **12**:259–93. doi:10.1146/annurev.12.040194.001355
56. Roche PA, Marks MS, Cresswell P. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* (1991) **354**:392–4. doi:10.1038/354392a0
57. Kvist S, Wiman K, Claesson L, Peterson PA, Dobberstein B. Membrane insertion and oligomeric assembly of HLA-DR histocompatibility antigens. *Cell* (1982) **29**:61–9. doi:10.1016/0092-8674(82)90090-3
58. Koch N, McLellan AD, Neumann J. A revised model for invariant chain-mediated assembly of MHC class II peptide receptors. *Trends Biochem Sci* (2007) **32**:532–7. doi:10.1016/j.tibs.2007.09.007
59. Williams DB, Watts TH. Molecular chaperones in antigen presentation. *Curr Opin Immunol* (1995) **7**:77–84. doi:10.1016/0952-7915(95)80032-8
60. Anderson KS, Cresswell P. A role for calnexin (IP90) in the assembly of class II MHC molecules. *EMBO J* (1994) **13**:675–82.
61. Koch N, Zacharias M, Ko A, Temme S, Neumann J, Springer S. Stoichiometry of HLA class II-invariant chain oligomers. *PLoS One* (2011) **6**:e17257. doi:10.1371/journal.pone.0017257
62. Majera D, Kristan KC, Neeffes J, Turk D, Mihelic M. Expression, purification and assembly of soluble multimeric MHC class II-invariant chain complexes. *FEBS Lett* (2012) **586**:1318–24. doi:10.1016/j.febslet.2012.03.038
63. Lamb CA, Cresswell P. Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes. *J Immunol* (1992) **148**:3478–82.
64. Arunachalam B, Pan M, Cresswell P. Intracellular formation and cell surface expression of a complex of an intact lysosomal protein and MHC class II molecules. *J Immunol* (1998) **160**:5797–806.
65. Anderson HA, Roche PA. Phosphorylation regulates the delivery of MHC class II invariant chain complexes to antigen processing compartments. *J Immunol* (1998) **160**:4850–8.
66. Yuan H, Michelsen K, Schwappach B. 14-3-3 Dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr Biol* (2003) **13**:638–46. doi:10.1016/S0960-9822(03)00208-2
67. Khalil H, Brunet A, Saba I, Terra R, Sekaly RP, Thibodeau J. The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int Immunol* (2003) **15**:1249–63. doi:10.1093/intimm/dxg124
68. Machamer CE, Cresswell P. Biosynthesis and glycosylation of the invariant chain associated with HLA-DR antigens. *J Immunol* (1982) **129**:2564–9.

69. Khalil H, Brunet A, Thibodeau J. A three-amino-acid-long HLA-DRbeta cytoplasmic tail is sufficient to overcome ER retention of invariant-chain p35. *J Cell Sci* (2005) **118**:4679–87. doi:10.1242/jcs.02592
70. Lamb CA, Yewdell JW, Bennink JR, Cresswell P. Invariant chain targets HLA class II molecules to acidic endosomes containing internalized influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1991) **88**:5998–6002. doi:10.1073/pnas.88.14.5998
71. Warmerdam PA, Long EO, Roche PA. Isoforms of the invariant chain regulate transport of MHC class II molecules to antigen processing compartments. *J Cell Biol* (1996) **133**:281–91. doi:10.1083/jcb.133.2.281
72. Kuwana T, Peterson PA, Karlsson L. Exit of major histocompatibility complex class II-invariant chain p35 complexes from the endoplasmic reticulum is modulated by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1998) **95**:1056–61. doi:10.1073/pnas.95.3.1056
73. Anderson HA, Bergstralh DT, Kawamura T, Blauvelt A, Roche PA. Phosphorylation of the invariant chain by protein kinase C regulates MHC class II trafficking to antigen-processing compartments. *J Immunol* (1999) **163**:5435–43.
74. Germain RN. The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature* (1986) **322**:687–98. doi:10.1038/322687a0
75. Ziegler HK, Unanue ER. Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1982) **79**:175–8. doi:10.1073/pnas.79.1.175
76. Ziegler K, Unanue ER. Identification of a macrophage antigen-processing event required for I-region-restricted antigen presentation to T lymphocytes. *J Immunol* (1981) **127**:1869–75.
77. Stumptner-Cuvellette P, Benaroch P. Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function. *Biochim Biophys Acta* (2002) **1542**:1–13. doi:10.1016/S0167-4889(01)00166-5
78. Landsverk OJB, Bakke O, Gregers TF. MHC II and the endocytic pathway: regulation by invariant chain. *Scand J Immunol* (2009) **70**:184–93. doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02301.x
79. Pieters J, Horstmann H, Bakke O, Griffiths G, Lipp J. Intracellular transport and localization of major histocompatibility complex class II molecules and associated invariant chain. *J Cell Biol* (1991) **115**:1213–23. doi:10.1083/jcb.115.5.1213
80. Roche PA, Teletski CL, Karp DR, Pinet V, Bakke O, Long EO. Stable surface expression of invariant chain prevents peptide presentation by HLA-DR. *EMBO J* (1992) **11**:2841–7.
81. Arunachalam B, Lamb CA, Cresswell P. Transport properties of free and MHC class II-associated oligomers containing different isoforms of human invariant chain. *Int Immunol* (1993) **6**:439–51. doi:10.1093/intimm/6.3.439
82. O'Kelly I, Butler MH, Zilberberg N, Goldstein SA. Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* (2002) **111**:577–88. doi:10.1016/S0092-8674(02)01040-1
83. Sato K. COPII coat assembly and selective export from the endoplasmic reticulum. *J Biochem* (2004) **136**:755–60. doi:10.1093/jb/mvh184
84. Zanetti G, Pahuja KB, Studer S, Shim S, Schekman R. COPII and the regulation of protein sorting in mammals. *Nat Cell Biol* (2012) **14**:20–8. doi:10.1038/ncb2390
85. Hiltbold EM, Roche PA. Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway. *Curr Opin Immunol* (2002) **14**:30–5. doi:10.1016/S0952-7915(01)00295-3
86. McCormick PJ, Martina JA, Bonifacio JS. Involvement of clathrin and AP-2 in the trafficking of MHC class II molecules to antigen-processing compartments. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) **102**:7910–5. doi:10.1073/pnas.0502206102
87. Dugast M, Toussaint H, Dousset C, Benaroch P. AP2 clathrin adaptor complex, but not AP1, controls the access of the major histocompatibility complex (MHC) class II to endosomes. *J Biol Chem* (2005) **280**:19656–64. doi:10.1074/jbc.M501357200
88. Kongsvik TL, Höning S, Bakke O, Rodionov DG. Mechanism of interaction between leucine-based sorting signals from the invariant chain and clathrin-associated adaptor protein complexes AP1 and AP2. *J Biol Chem* (2002) **277**:16484–8. doi:10.1074/jbc.M201583200
89. Pieters J, Bakke O, Dobberstein B. The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J Cell Sci* (1993) **106**:831–46.
90. Romagnoli P, Layet C, Yewdell J, Bakke O, Germain RN. Relationship between invariant chain expression and major histocompatibility complex class II transport into early and late endocytic compartments. *J Exp Med* (1993) **177**:583–96. doi:10.1084/jem.177.3.583
91. Gorvel JP, Escola JM, Bakke O. Invariant chain induces a delayed transport from early to late endosomes. *J Biol Chem* (1995) **270**:2741–6. doi:10.1074/jbc.270.6.2741
92. Gregers TF, Nordeng TW, Birkeland HC, Sandlie I, Bakke O. The cytoplasmic tail of invariant chain modulates antigen processing and presentation. *Eur J Immunol* (2003) **33**:277–86. doi:10.1002/immu.200310001
93. Stang E, Bakke O. MHC class II associated invariant chain induced enlarged endosomal structures. A morphological study. *Exp Cell Res* (1997) **235**:79–92. doi:10.1006/excr.1997.3617
94. Fineschi B, Miller J. Endosomal proteases and antigen processing. *Trends Biochem Sci* (1997) **22**:377–82. doi:10.1016/S0968-0004(97)01116-X
95. Driessen C, Bryant RAR, Lennon-Duménil AM, Villadangos JA, Bryant PW, Shi GP, et al. Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells. *J Cell Biol* (1999) **147**:775–90. doi:10.1083/jcb.147.4.775
96. Villadangos JA, Ploegh HL. Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? *Immunity* (2000) **12**:233–9. doi:10.1016/S1074-7613(00)80176-4
97. Zavanik-Bergant V, Schweiger A, Bevec T, Golouh R, Turk V, Kos J. Inhibitory p41 isoform of invariant chain and its potential target enzymes cathepsins L and H in distinct populations of macrophages in human lymph nodes. *Immunology* (2004) **112**:378–85. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01879.x
98. Faure-André G, Vargas P, Yuseff M, Heuzé M, Vascotto F, Boulanger J, et al. Regulation of dendritic cell migration by CD74, the MHC class II-associated invariant chain. *Science* (2008) **322**:1705–10. doi:10.1126/science.1159894
99. Yuseff M-I, Pierobon P, Reversat A, Lennon-Duménil A-M. How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nat Rev Immunol* (2013) **13**:475–86. doi:10.1038/nri3469
100. Castellino F, Germain RN. Extensive trafficking of MHC class II-invariant chain complexes in the endocytic pathway and appearance of peptide-loaded class II in multiple compartments. *Immunity* (1995) **2**:73–88. doi:10.1016/1074-7613(95)90080-2
101. Bosch B, Berger AC, Khandelwal S, Heipertz EL, Scharf B, Santambrogio L, et al. Disruption of multivesicular body vesicles does not affect MHC class II-peptide complex formation and antigen presentation by dendritic cells. *J Biol Chem* (2013) **288**(34):24286–92. doi:10.1074/jbc.M113.461996
102. Nordeng TW, Gregers TF, Kongsvik TL, Mereske S, Gorvel JP, Jourdan F, et al. The cytoplasmic tail of invariant chain regulates endosome fusion and morphology. *Mol Biol Cell* (2002) **13**:1846–56. doi:10.1091/mbc.01-10-0478
103. Gedde-Dahl M, Freiswinkel I, Staschewski M, Schenck K, Koch N, Bakke O. Exon 6 is essential for invariant chain trimerization and induction of large endosomal structures. *J Biol Chem* (1997) **272**:8281–7. doi:10.1074/jbc.272.13.8281
104. Gelin C, Sloma I, Charron D, Mooney N. Regulation of MHC II and CD1 antigen presentation: from ubiquity to security. *J Leukoc Biol* (2009) **85**:215–24. doi:10.1189/jlb.0308206
105. Basha G, Omilusik K, Chavez-Steenbock A, Reinicke AT, Lack N, Choi KB, et al. A CD74-dependent MHC class I endolysosomal cross-presentation pathway. *Nat Immunol* (2012) **13**:237–45. doi:10.1038/ni.2225
106. Arneson LS, Miller J. The chondroitin sulfate form of invariant chain trimerizes with conventional invariant chain and these complexes are rapidly transported from the trans-Golgi network to the cell surface. *Biochem J* (2007) **406**:97–103. doi:10.1042/BJ20070446
107. Naujokas MF, Morin M, Anderson MS, Peterson M, Miller J. The chondroitin sulfate form of invariant chain can enhance stimulation of T cell responses through interaction with CD44. *Cell* (1993) **74**:257–68. doi:10.1016/0092-8674(93)90417-O
108. Beswick EJ. CD74 in antigen presentation, inflammation, and cancers of the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* (2009) **15**:2855. doi:10.3748/wjg.15.2855
109. Matza D, Kerem A, Shachar I. Invariant chain, a chain of command. *Trends Immunol* (2003) **24**:264–8. doi:10.1016/S1471-4906(03)00073-5
110. Beisner DR, Langerak P, Parker AE, Dahlberg C, Otero FJ, Sutton SE, et al. The intramembrane protease Sppl2a is required for B cell and DC development and survival via cleavage of the invariant chain. *J Exp Med* (2013) **210**:23–30. doi:10.1084/jem.20121072

111. Schneppenheim J, Dressel R, Hüttl S, Lüllmann-Rauch R, Engelke M, Dittmann K, et al. The intramembrane protease SPPL2a promotes B cell development and controls endosomal traffic by cleavage of the invariant chain. *J Exp Med* (2013) **210**:41–58. doi:10.1084/jem.20121069
112. Veenstra H, Jacobs P, Dowdle EB. Processing of HLA-class II invariant chain and expression of the p35 form is different in malignant and transformed cells. *Blood* (1993) **82**:2494–500.
113. Veenstra H, Jacobs P, Dowdle EB. Abnormal association between invariant chain and HLA class II alpha and beta chains in chronic lymphocytic leukemia. *Cell Immunol* (1996) **171**:68–73. doi:10.1006/cimm.1996.0174
114. Yan G, Shi L, Penforis A, Faustman DL. Impaired processing and presentation by MHC class II proteins in human diabetic cells. *J Immunol* (2003) **170**:620–7.
115. Sanderson S, Frauwirth K, Shastri N. Expression of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes derived from invariant chain-antigen fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995) **92**:7217–21. doi:10.1073/pnas.92.16.7217
116. Holst PJ, Sorensen MR, Mandrup Jensen CM, Orskov C, Thomsen AR, Christensen JP. MHC class II-associated invariant chain linkage of antigen dramatically improves cell-mediated immunity induced by adenovirus vaccines. *J Immunol* (2008) **180**:3339–46.
117. Malcherek G, Wirblich C, Willcox N, Rammensee HG, Trowsdale J, Melms A. MHC class II-associated invariant chain peptide replacement by T cell epitopes:

engineered invariant chain as a vehicle for directed and enhanced MHC class II antigen processing and presentation. *Eur J Immunol* (1998) **28**:1524–33. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199805)28:05<1524::AID-IMMU1524>3.0.CO;2-T

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 16 August 2013; accepted: 26 November 2013; published online: 13 December 2013.

Citation: Fortin J-S, Cloutier M and Thibodeau J (2013) Exposing the specific roles of the invariant chain isoforms in shaping the MHC class II peptidome. *Front. Immunol.* **4**:443. doi: 10.3389/fimmu.2013.00443

This article was submitted to *Antigen Presenting Cell Biology*, a section of the journal *Frontiers in Immunology*.

Copyright © 2013 Fortin, Cloutier and Thibodeau. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Interleukin-10-induced MARCH1 mediates intracellular sequestration of MHC class II in monocytes

Jacques Thibodeau^{1,2}, Marie-Claude Bourgeois-Daigneault^{*1,2,3},
Gabrielle Huppé^{*4}, Jessy Tremblay^{1,2}, Angélique Aumont⁴, Mathieu Houde³,
Eric Bartee⁵, Alexandre Brunet¹, Marie-Elaine Gauvreau¹, Aude de Gassart⁶,
Evelina Gatti⁶, Martin Baril³, Maryse Cloutier^{1,2}, Séverine Bontron⁷,
Klaus Früh⁵, Daniel Lamarre^{2,3} and Viktor Steimle⁴

¹ Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, QC, Canada

² INSERM U 743, Université de Montréal, QC, Canada

³ Institut de recherche en immunologie et en oncologie, IRIC, Université de Montréal, QC, Canada

⁴ Département de biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada

⁵ Vaccine and Gene Therapy Institute, Oregon Health and Science University, Beaverton, OR, USA

⁶ Centre d'immunologie de Marseille-Luminy, INSERM U631, CNRS UMR6102, Université de la Méditerranée, Marseille, France

⁷ Département de zoologie et biologie animale, Université de Genève, Genève, Suisse

IL-10 is a potent anti-inflammatory cytokine interfering with antigen presentation by inducing the intracellular sequestration of MHC class II (MHC-II) molecules. Here we studied the contribution of membrane-associated RING-CH (MARCH) ubiquitin ligase family members to the IL-10-induced down-regulation of MHC-II molecules. We found that MARCH1 and MARCH8 proteins are the most potent family members for the down-regulation of MHC-II surface expression in transfected cells, but only MARCH1 mRNA expression is strongly induced by IL-10 in human primary monocytes. We detected mono- and poly-ubiquitinated forms of MHC-II molecules both in IL-10-treated monocytes and in cells transfected with MARCH1. We also show direct interaction between MHC-II and MARCH1 molecules in co-immunoprecipitation assays. Finally, we found that siRNA-mediated knockdown of MARCH1 reverses IL-10-induced MHC-II down-regulation in primary monocytes. Thus, the immunosuppressive effect of IL-10 on antigen presentation is mediated through induced expression of MARCH1.

Key words: Antigen-presenting cells · Cytokines · Immune regulation · Inflammation · MHC



Supporting Information available online

Introduction

MHC class II (MHC-II) molecules play an essential role during the cellular immune response by presenting pathogen-derived peptides to CD4⁺ T helper cells. MHC-II genes and molecules show

complex and regulated expression patterns controlled both at the transcriptional and post-translational levels. Constitutive and IFN- γ -inducible MHC-II gene expression are largely under the control of the MHC-II transactivator CIITA [1, 2].

Several examples of post-translational control of MHC-II transport have been described, especially in the myeloid lineages

Correspondence: Jacques Thibodeau or Viktor Steimle
e-mail: jacques.thibodeau@umontreal.ca or
viktor.steimle@usherbrooke.ca

* These authors contributed equally

of cells. In monocyte-derived immature DC, MHC-II molecules are mainly sequestered in intracellular compartments and DC maturation leads to re-localization of MHC-II molecules at the cell surface, while at the same time MHC-II gene transcription is shut off [3–5]. Interestingly, it has been shown recently that intracellular localization of MHC-II molecules in immature DC coincides with ubiquitination of the cytoplasmic tail of MHC-II β -chains by an as yet unidentified ubiquitin ligase, and that MHC-II ubiquitination is lost during DC maturation [6, 7].

In monocytes, the capacity to stimulate CD4 T cell responses is strongly inhibited by the immunosuppressive activity of IL-10. This pleiotropic anti-inflammatory cytokine interferes with antigen presentation by down-regulating both MHC-II and the costimulatory molecules CD80 and CD86 [8–10]. In human primary monocytes, IL-10 did not affect MHC-II gene transcription, protein synthesis or loading of the MHC-II $\alpha\beta$ complexes with antigenic peptides. Rather, IL-10-treatment caused the intracellular accumulation of mature MHC-II complexes and prevented their display at the plasma membrane by an unidentified mechanism [9].

Membrane-associated RING-CH (MARCH) proteins are cellular homologs of viral transmembrane E3-ubiquitin ligases, such as the KSHV8 K3 (MIR 1) and K5 (MIR 2) molecules, which have been shown to ubiquitinate the cytoplasmic tails of MHC-I molecules [11, 12]. Nine human MARCH protein family members have been described [13]. MARCH8 (c-MIR) was shown to down-regulate CD86 [14], an activity that was shared by MARCH1 and MARCH2 [13]. More recently, transgenic overexpression of MARCH8 led to reduced MHC-II cell surface expression in mice [15], while B cells from MARCH1-deficient mice showed increased expression of MHC-II at the plasma membrane [16].

Thus, IL-10-induced down-regulation of cell surface MHC-II and CD86 in monocytes was reminiscent of the activities of MARCH8 and MARCH1. Here, we identify MARCH1 as the mediator of the IL-10-induced immunosuppressive effect on the MHC-II antigen-presentation pathway.

Results and discussion

IL-10 induces the expression of MARCH1

As expected, IL-10 strongly inhibited HLA-DR and CD86 cell surface expression in CD14⁺ primary monocytes (Fig. 1A) and MHC-II molecules accumulated in internal vesicles in these cells (Supporting Information Fig. S1). We first compared the capacity of MARCH protein family members with a similar membrane topology to MARCH1 and –8 [13] to down-regulate MHC-II cell surface expression. We found that the highly homologous MARCH1 and –8 proteins were the most potent in reducing the CIITA-induced cell surface expression of HLA-DR in transiently transfected 293EBNA cells, but other MARCH proteins also had a certain inhibitory effect under these conditions (Fig. 1B). MARCH4 expression negatively affected cell survival and thus seemed to have a more general effect (data not shown). MARCH1

and –8 efficiently down-regulated all three human MHC-II isotypes; HLA-DR, -DQ, and -DP (Supporting Information Fig. S2).

Next, we analyzed *via* quantitative RT-PCR the mRNA expression levels of MARCH family members in cells treated with IL-10 (Fig. 1C). In untreated primary monocytes, the MARCH1, –2 and –8 mRNA were at comparable low levels, which were not affected by treatment with IFN- γ (Fig. 1C, lanes 1 and 2). However, addition of IL-10 for 16 h increased MARCH1 mRNA expression over 40-fold for the representative donor shown in Fig. 1C (lane 4), while MARCH2 and –8 levels increased only 2–3-fold. IL-10-induced expression of MARCH1 was independent of the presence of IFN- γ (data not shown). The lack of sensitivity of

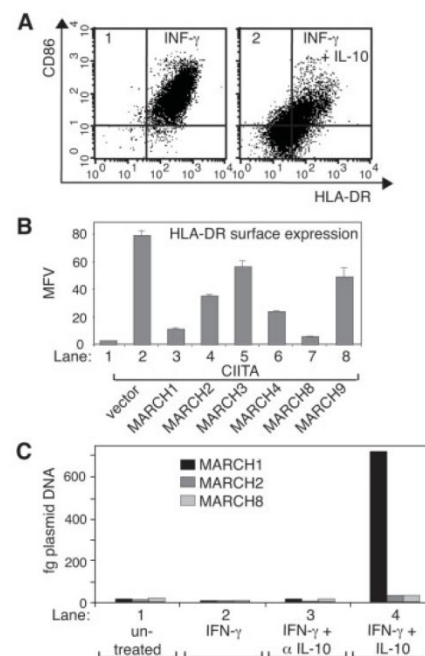


Figure 1. IL-10 induces MARCH1 expression. (A) Primary human monocytes were incubated with IFN- γ in the absence (panel 1) or presence (panel 2) of IL-10 for 16 h and analyzed by flow cytometry for HLA-DR and CD86 expression. (B) 293EBNA cells were transiently co-transfected with EGFP (lanes 1–8), CIITA (lanes 2–8), and with MARCH cDNA (lanes 3–8) and analyzed by flow cytometry after 48 h. Shown are mean fluorescence values (MFV) of cell surface HLA-DR expression gated on EGFP-positive cells. Values and SD are derived from duplicates of independent transfections. (C) MARCH1, –2, and –8 mRNA expression in primary human monocytes was analyzed by real-time RT-PCR. Cells were left either untreated (lane 1), or incubated for 16 h in the presence of IFN- γ (lane 2), IFN- γ and an anti-IL-10 mAb (20 μ g/mL; lane 3) or IFN- γ and IL-10 (lane 4). Samples were normalized for HPRT expression and results are expressed as the amount of equivalent linearized plasmid DNA standard for each MARCH. Shown is a representative example from three independent donors.

MARCH-specific antibodies precluded the analysis of protein expression in these cells. MARCH3, -4 and -9 mRNA expression levels were undetectable or very low and not responsive to IL-10 or IFN- γ in monocytes (data not shown). These results suggested that IL-10-induced MARCH1 expression may be important for the observed immunosuppressive effects in monocytes.

MARCH1 ubiquitinates HLA-DR molecules

Ubiquitination of mouse MHC-II β -chains by MARCH proteins has been described recently [15, 16]. We thus looked for ubiquitinated forms of HLA-DR in HeLa/C1ITA cells expressing MARCH1. HLA-DR molecules were immunoprecipitated with mAb L243 and

analyzed by western blotting using the ubiquitin-specific mAb P4D1 (Fig. 2A, upper panel). HLA-DR molecules showed the presence of a band of 40–42 kDa, which is compatible with the size of an HLA-DR β -chain (28–30 kDa) bearing one ubiquitin moiety (arrowhead), only in MARCH1-positive and not in vector-transfected cells (Fig. 2A). A band of similar size corresponding to mono-ubiquitinated MHC-II I-A β was observed in immature mouse DC [6]. Interestingly, a typical ladder of ubiquitinated material (bracket) was detected at higher molecular weights, suggesting that the β -chain is also poly-ubiquitinated in MARCH1-positive cells. L243 recognizes peptide-loaded MHC-II [17], indicating that MARCH1 can ubiquitinate mature HLA-DR molecules.

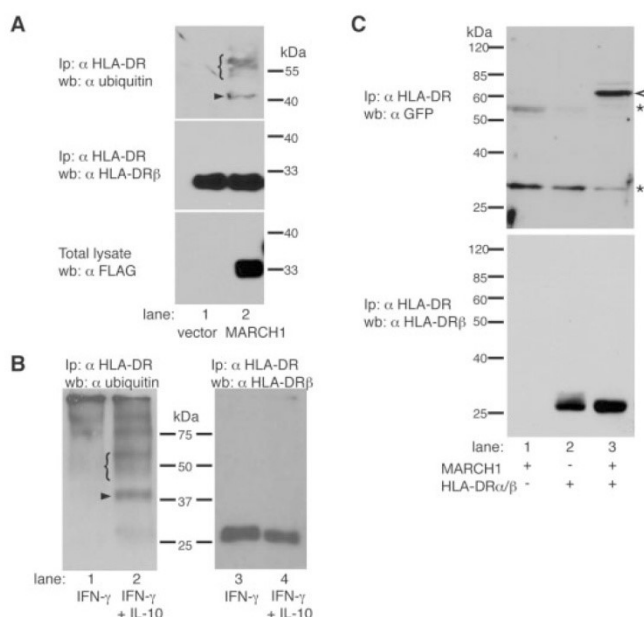


Figure 2. HLA-DR is ubiquitinated in MARCH1-transfected cells as well as in IL-10 treated monocytes, and interacts with MARCH1. (A) HeLa/C1ITA cells were transfected with empty vector (lane 1) or an expression plasmid for FLAG-tagged MARCH1 (lane 2). At 24 h post transfection, cells were lysed and HLA-DR was immunoprecipitated using L243. Samples were separated by SDS-PAGE and analyzed on immunoblots using the ubiquitin-specific mAb P4D1 (top panel) and HLA-DR β -specific mAb XD5.117 (middle panel). Total lysates were analyzed by immunoblotting with FLAG-specific mAb M2 (bottom panel). The arrowhead indicates the presence of mono-ubiquitinated HLA-DR β , the bracket that of polyubiquitinated molecules. (B) Primary human monocytes were cultured for 16 h in the presence of IFN- γ (lanes 1, 3) or IFN- γ plus IL-10 (lanes 2, 4). Cells were lysed and HLA-DR molecules were immunoprecipitated with L243. Non-reduced samples were separated by SDS-PAGE and analyzed for ubiquitin by immunoblotting using P4D1 (left panel). The membrane was stripped and incubated with the HLA-DR β -specific mAb XD5.117 (right panel). Similar results were obtained using cells from a second donor (data not shown). (C) 293T cells were transiently transfected with EYFP-MARCH1 alone (lane 1), with HLA-DR α/β (lane 2), or co-transfected with HLA-DR α/β and EYFP-MARCH1 (lane 3). At 24 h post transfection, cells were lysed and HLA-DR molecules were immunoprecipitated with mAb L243. Samples were separated by SDS-PAGE and analyzed on an immunoblot with a GFP-specific antiserum (top panel). The arrowhead indicates the presence of the EYFP-MARCH1 fusion protein (predicted molecular mass 58.4 kDa) and the asterisks indicate the Ig heavy and light chains. EYFP-MARCH1 expression in samples from lanes 1 and 3 was verified by flow cytometry (data not shown). The membrane was stripped and incubated with the HLA-DR β specific mAb XD5.117 (bottom panel).

IL-10 induces ubiquitination of MHC-II in monocytes

We next immunoprecipitated HLA-DR molecules from IL-10-treated monocytes. Western blotting for ubiquitin revealed the presence of a major band of about 40 kDa and a smear of higher molecular weight in the sample treated with IL-10 (Fig. 2B, left panel). This is very similar to the pattern observed in HeLa/CITTA cells transfected with MARCH1 (Fig. 2A), suggesting that IL-10 induces both mono- and poly-ubiquitination of MHC-II molecules. Bands corresponding to ubiquitinated HLA-DR β chains could not be revealed when the immunoprecipitated material was re-blotted with XD5.117, probably due to their low abundance (Fig. 2B, right panel). These results clearly indicate that IL-10 induces ubiquitination of HLA-DR molecules in monocytes.

MARCH1 interacts with HLA-DR

The presence of a RING-CH E3-type ubiquitin ligase domain in MARCH1 suggests that the latter comes close to MHC-II molecules in a multimolecular ubiquitination complex. We tested for direct interaction between HLA-DR molecules and MARCH1 by co-immunoprecipitation. 293T cells were transiently transfected with HLA-DR and an enhanced yellow fluorescent protein (EYFP)-MARCH1 fusion protein either alone or in combination. EYFP-MARCH1 was fully functional for the down-regulation of MHC-II molecules (Supporting Information Fig. S3). HLA-DR molecules were immunoprecipitated with mAb L243 and analyzed by western blotting (Fig. 2C). A GFP-specific antiserum revealed co-immunoprecipitated EYFP-MARCH1 only in cells co-expressing HLA-DR and EYFP-MARCH1 (Fig. 2C, top panel, lane 3). We also detected *in vivo* interactions between HLA-DR and MARCH1 in intracellular vesicles by fluorescence energy transfer (FRET) microscopy (data not shown). These results suggest that HLA-DR β is a direct substrate for the MARCH1 E3 ubiquitin ligase activity.

Knockdown of MARCH1 reverses IL-10-induced down-regulation of MHC-II in monocytes

We transfected IFN- γ -stimulated primary monocytes with fluorescent siRNA in the presence or absence of IL-10. Control siRNA had no effect on MHC-II expression under any condition tested, nor did MARCH1-specific siRNA affect the levels of cell surface MHC-II expression in the absence of IL-10 (Fig. 3A). In contrast, knockdown of MARCH1 strongly inhibited IL-10-dependent down-regulation of cell surface HLA-DR (Fig. 3A, compare green and red profiles). MARCH1 protein levels could not be analyzed due to lack of antibody sensitivity, but MARCH1 mRNA levels were reduced by 70% in cells treated with MARCH1-directed siRNA (Fig. 3B). These results demonstrate that MARCH1 is necessary for the IL-10-induced MHC-II down-regulation in monocytes.

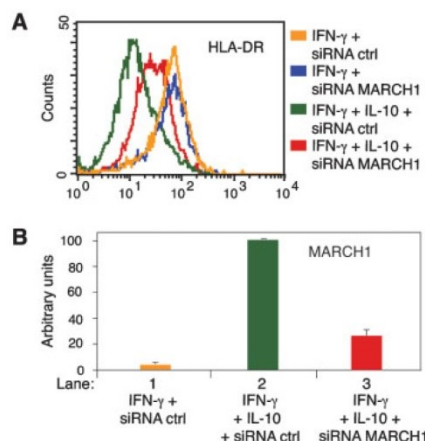


Figure 3. IL-10 induced down-regulation of MHC-II is dependent on MARCH1. Primary human monocytes were transfected with fluorescent-labeled (Alexa 488) control or MARCH1-specific siRNA. Cells were cultured for 16 h in the presence of IFN- γ or IFN- γ plus IL-10. (A) HLA-DR cell surface expression of siRNA-transfected cells was analyzed by flow cytometry. (B) MARCH1 mRNA expression of the cells shown in (A) was analyzed by real-time RT-PCR. Samples were normalized for HPRT expression and MARCH1 expression of the sample in lane 2 was arbitrarily set at 100. Values and SD are from duplicate PCR. Similar results were obtained on another donor.

Concluding remarks

The results presented here provide strong evidence that negative modulation of antigen-presentation function in monocytes by IL-10 is mediated by the induction of MARCH1. Our finding of ubiquitinated HLA-DR molecules in MARCH1-transfected cells and in IL-10-treated monocytes is the first demonstration of this modification in human MHC-II molecules. Down-regulation of murine MHC-II proteins by murine MARCH1 and -8 has been found to be dependent on the single lysine residue in the cytoplasmic tail of the β -chain [15, 16]. As expected, we found that the corresponding lysine residue in the cytoplasmic tail of HLA-DR β is also important for MARCH1-induced down-regulation of human HLA-DR molecules (Supporting Information Fig. S3). Co-immunoprecipitation indicates that MARCH1 and HLA-DR molecules interact directly. We detected a relatively important fraction of HLA-DR molecules, both in MARCH1-transfected cells and in IL-10-treated monocytes, that appeared to be mono-ubiquitinated in addition to poly-ubiquitinated. Mono- and oligo-ubiquitination have been shown to be important sorting signals for membrane proteins, inducing mostly sorting to endosomal and lysosomal vesicles [18]. Accordingly, studies in mouse DC showed that ubiquitination prevents recycling and increases the targeting of MHC-II into luminal vesicles of multivesicular bodies [7, 16].

While MARCH1 and -8 have very similar effects in down-regulating MHC-II, they appear to be expressed quite indepen-

dently. MARCH8 expression appears to be broadly distributed with highest levels in lung and pancreas [13]. On the other hand, the highest levels of human MARCH1 mRNA expression was found in lymph node and splenic tissues [13], and MARCH1 is important for the regulation of MHC-II in murine B cells [16]. In addition, MARCH1 is expressed in immature human DC and is down-regulated during DC maturation [19]. Our results show that IL-10 modulates mainly the expression of MARCH1 and this is the first demonstration of the regulation of MARCH gene expression by cytokines and its impact under physiological conditions. Analysis of the contribution of MARCH gene regulation to immunopathology will be of great future interest.

Materials and methods

Plasmids

Expression vectors for the different MARCH protein, EBS-CIITA and EBS-enhanced GFP (EGFP) constructs have been described previously [13, 20]. An N-terminal fusion between EYFP (Clontech) and MARCH1 was generated by PCR and cloned into the cDNA expression vector pcDNA3.1 (Invitrogen).

Antibodies

The HLA-DR-specific mAb L243 and XD5.117 have been described previously [21]. L243-allophycocyanin and CD86-PE (IT2.2) were from BD Biosciences. HLA-DR specific HK14-QuantumRed and FLAG-specific M2 mAb were from Sigma. P4D1 is specific for ubiquitin (Covance). The GFP-specific rabbit antiserum was from Invitrogen. Rat anti-human IL-10 was from Serotec.

Cell culture

Experiments with human primary monocytes were approved by institutional ethics committees. Human monocytes were isolated by positive selection of CD14⁺ cells (Miltenyi Biotec) from PBMC obtained by leukapheresis. Cells were incubated for 16 h at 37°C with human recombinant IFN- γ and IL-10 (Peprotech) at 167 and 0.1 ng/mL, respectively. siRNA experiments were performed on fresh monocytes using non-targeting control or MARCH1-specific cocktails of siRNA from Qiagen (1.3 nM; coupled to Alexa 488) and Dharmacon (ON-TARGETplus SMARTpool; 0.6 nM). Cells were electroporated prior to the addition of IFN- γ and IL-10 using an Amaxa Nucleofector II and the Amaxa Monocyte Nucleofection kit. Transfection efficiency was between 20 and 40% and only transfected fluorescent cells were found to be responsive to IL-10. Flow cytometry analysis was performed on live, Alexa 488-positive cells.

Immunoprecipitation and western blotting

HeLa/CIITA cells and primary monocytes were lysed in buffer containing 1% Triton X-100, 25 mM N-ethylmaleimide, 5 μ M MG132 (all from Sigma) and protease inhibitors (Roche). MHC-II molecules were immunoprecipitated with L243 and heated at 95°C for 5 min in gel-loading buffer. Samples were resolved by SDS-PAGE and analyzed by western blotting. For the co-immunoprecipitation experiment, 293T cells were lysed in buffer containing 1% CHAPS.

Quantitative RT-PCR analysis

Total RNA from 10⁶ frozen monocytes was isolated (Absolutely RNA kit; Stratagene) and first-strand cDNA generated (Expand RT, Roche). Real-time PCR was performed using SYBR Green reagents (Invitrogen) on a Stratagene MX3000P instrument. Samples were normalized for HPRT expression. Quantification was carried out via standard dilution curves of linearized plasmid DNA. All primer pairs except those for MARCH2 are located in different exons or span intron/exon boundaries. All PCR experiments were repeated at least twice with highly comparable results. Primer sequences are shown in the Supporting Information Table 1.

Acknowledgements: We thank Rafick Sékaly for cDNA and vectors, and Philippe Pierre for helpful discussions. This work was supported by NIH grants R01 CA/AI094011-04 and R21 CA109674-02, and the Medical Research Foundation to K.F. E.B. is supported by an institutional training grant for molecular pathogenesis (T32 AI007472). J. Thibodeau, A.B. and V.S. are scholars of the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). J. Thibodeau is supported by a Canadian Institutes for Health Research (CIHR)-INSERM International Scientific Exchanges fellowship. D.L. holds the Novartis /Canadian Liver Foundation Hepatology Research Chair. J. Thibodeau and D.L. are supported by the CIHR and INSERM. V.S. is supported by the National Science and Engineering Research Council of Canada (NSERC, grant 262845-03) and the Canadian Foundation for Innovation (CFI).

Conflict of interest: The authors declare no financial or commercial conflict of interest.

References

- 1 Steimle, V., Otten, L. A., Zufferey, M. and Mach, B., Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* 1993. 75: 135–146.
- 2 LeibundGut-Landmann, S., Waldburger, J. M., Krawczyk, M., Otten, L. A., Suter, T., Fontana, A., Acha-Orbea, H. and Reith, W., Mini-review:

- Specificity and expression of CIITA, the master regulator of MHC class II genes. *Eur. J. Immunol.* 2004. **34**: 1513–1525.
- 3 Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J. and Lanzavecchia, A., Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 1997. **388**: 782–787.
 - 4 Pierre, P., Turley, S. J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K. et al., Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 1997. **388**: 787–792.
 - 5 Landmann, S., Muhlethaler-Mottet, A., Bernasconi, L., Suter, T., Waldburger, J. M., Masternak, K., Arrighi, J. F. et al., Maturation of dendritic cells is accompanied by rapid transcriptional silencing of class II transactivator (CIITA) expression. *J. Exp. Med.* 2001. **194**: 379–391.
 - 6 Shin, J. S., Ebersold, M., Pypaert, M., Delamarre, L., Hartley, A. and Melman, I., Surface expression of MHC class II in dendritic cells is controlled by regulated ubiquitination. *Nature* 2006. **444**: 115–118.
 - 7 van Niel, G., Wubboldts, R., Ten Broeke, T., Buschow, S. I., Ossendorp, F. A., Melief, C. J., Raposo, G. et al., Dendritic cells regulate exposure of MHC class II at their plasma membrane by oligoubiquitination. *Immunity* 2006. **25**: 885–894.
 - 8 Willems, F., Marchant, A., Delville, J. P., Gerard, C., Delvaux, A., Velu, T., de Boer, M. and Goldman, M., Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 1994. **24**: 1007–1009.
 - 9 Koppelman, B., Neefjes, J. J., de Vries, J. E. and de Waal Malefyt, R., Interleukin-10 down-regulates MHC class II alpha/beta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity* 1997. **7**: 861–871.
 - 10 Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. and O'Garra, A., Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 2001. **19**: 683–765.
 - 11 Lehner, P. J., Hoer, S., Dodd, R. and Duncan, L. M., Downregulation of cell surface receptors by the K3 family of viral and cellular ubiquitin E3 ligases. *Immunol. Rev.* 2005. **207**: 112–125.
 - 12 Ohmura-Hoshino, M., Goto, E., Matsuki, Y., Aoki, M., Mito, M., Uematsu, M., Hotta, H. and Ishido, S., A novel family of membrane-bound e3 ubiquitin ligases. *J. Biochem. (Tokyo)* 2006. **140**: 147–154.
 - 13 Barteet, E., Mansouri, M., Hovey Nerenberg, B. T., Gouveia, K. and Fruh, K., Downregulation of major histocompatibility complex class I by human ubiquitin ligases related to viral immune evasion proteins. *J. Virol.* 2004. **78**: 1109–1120.
 - 14 Goto, E., Ishido, S., Sato, Y., Ohgimoto, S., Ohgimoto, K., Nagano-Fujii, M. and Hotta, H., c-MIR, a human E3 ubiquitin ligase, is a functional homolog of herpesvirus proteins MIR1 and MIR2 and has similar activity. *J. Biol. Chem.* 2003. **278**: 14657–14668.
 - 15 Ohmura-Hoshino, M., Matsuki, Y., Aoki, M., Goto, E., Mito, M., Uematsu, M., Kakiuchi, T. et al., Inhibition of MHC class II expression and immune responses by c-MIR. *J. Immunol.* 2006. **177**: 341–354.
 - 16 Matsuki, Y., Ohmura-Hoshino, M., Goto, E., Aoki, M., Mito-Yoshida, M., Uematsu, M., Hasegawa, T. et al., Novel regulation of MHC class II function in B cells. *EMBO J.* 2007. **26**: 846–854.
 - 17 Roche, P. A. and Cresswell, P., Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding. *Nature* 1990. **345**: 615–618.
 - 18 Katzmann, D. J., Odorizzi, G. and Emr, S. D., Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2002. **3**: 893–905.
 - 19 de Gassart, A., Camossetto, V., Thibodeau, J., Ceppi, M., Catalan, N., Pierre, P. and Gatti, E., MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008. **105**: 3491–3496.
 - 20 Hake, S. B., Masternak, K., Kammerbauer, C., Janzen, C., Reith, W. and Steimle, V., CIITA leucine rich repeats control nuclear localisation, *in vivo* recruitment to the MHC class II enhanceosome, and MHC class II gene transactivation. *Mol. Cell. Biol.* 2000. **20**: 7716–7725.
 - 21 Khalil, H., Brunet, A., Saba, I., Terra, R., Sekaly, R. P. and Thibodeau, J., The MHC class II beta chain cytoplasmic tail overcomes the invariant chain p35-encoded endoplasmic reticulum retention signal. *Int. Immunol.* 2003. **15**: 1249–1263.

Abbreviations: **MARCH**: membrane-associated RING-CH · **EGFP**: enhanced green fluorescent protein · **EYFP**: enhanced yellow fluorescent protein

Full correspondence: Jacques Thibodeau, Département de microbiologie et immunologie, C.P. 6128, Succ. Centre-Ville, Université de Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada
Fax: +1-514-343-5701
e-mail: jacques.thibodeau@umontreal.ca

Additional correspondence: Viktor Steimle, Département de Biologie, Université de Sherbrooke, 2500 boul. Université, Sherbrooke, QC, J1k 2R1, Canada
Fax: +1-819-821-8049
e-mail: viktor.steimle@usherbrooke.ca

Supporting Information for this article is available at
www.wiley-vch.de/contents/jc_2040/2008/37902_s.pdf

Received: 5/10/07
Revised: 15/1/08
Accepted: 21/2/08